ENZYMOLOGIE UND GENETIK DER GLYCOSIDIERUNGS- UND ACYLISIERUNGSREAKTIONEN IN DER FLAVONOID-BIOSYNTHESE HÖHERER PFLANZEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von
MONIKA TEUSCH
aus Wittlich

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0032

ENZYMOLOGIE UND GENETIK

DER GLYCOSIDIERUNGS- UND ACYLISIERUNGSREAKTIONEN

IN DER FLAVONOID-BIOSYNTHESE HÖHERER PFLANZEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Monika Teusch

aus Wittlich

1986

Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juli 1986

Dekan:	Professor Dr. R. Hampp
1. Berichterstatter:	Professor Dr. W. Seyffert
2. Berichterstatter:	Privatdozent Dr. G.Forkmann

Teile dieser Arbeit werden veröffentlicht in:

UDP-Glucose: anthocyanidin/flavonol 3-O-glucosyltransferase in enzyme preparation from flower extracts of genetically defined lines of Matthiola incana R. Br.
M. Teusch, G. Forkmann, W. Seyffert
Z. Naturforschung (in press)

Genetic control of UDP-Glucose:anthocyan 5-O-glucosyltransferase from flowers of Matthiola incana R. Br.
M. Teusch, G. Forkmann, W. Seyffert
Planta (in press)

Genetic control of hydroxycinnamoyl-Coenzyme A: anthocyanidin 3-glycoside-hydroxycinnamoyltransferase from petals of Matthiola incana R. Br.
M. Teusch, G. Forkmann, W. Seyffert
Phytochemistry (in press)

UDP-Xylose: anthocyanidin 3-O-glucoside-xylosyltransferase from petals of Matthiola incana R. Br.
M. Teusch
Planta (in press)

Herrn Prof. Dr. W. Seyffert danke ich für die Überlassung des Themas, für die hilfreichen Diskussionen und für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. habil. G. Forkmann gilt mein Dank für die vielen Ratschläge und Diskussionen.

Herrn Dr. W. Heller (Universität Freiburg) danke ich für die Überlassung verschiedener Hydroxyzimtsäure-CoA-Ester.

Bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere Frau V. Belkaceme, möchte ich mich für die menschliche und herzliche Atmosphäre bedanken.

Herrn H. Schneider danke ich für die technische Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. MATERIAL UND METHODEN	9
2.1. Pflanzenmaterial	9
2.2. Enzympraeparation	10
2.2.1. Praeparation des Rohextraktes	10
2.2.2. Gelfiltration des Rohextraktes	10
2.2.3. Mikrosomenpraeparation	11
2.2.4. $(NH_4)_2SO_4$ - Faellung	12
2.3. Parameterabhaengigkeit	14
2.3.1. Zeitlinearitaet	14
2.3.2. Proteinabhaengigkeit	14
2.3.3. pH-Abhaengigkeit	14
2.3.4. Temperaturabhaengigkeit	15
2.3.5. Abhaengigkeit von der Substratkonzentration	15
2.3.5.1. Abhaengigkeit von UDP-Glucose, UDP-Xylose und CoA-Ester	15
2.3.5.2. Abhaengigkeit von der Anthocyankonzentration	15
2.3.6. Stabilitaet des Enzyms	16
2.3.7. Einfluss von Ionen und Hemmstoffen	16
2.3.8. Substratspezifitaet	16
2.4. Optimierte Testbedingungen	17
2.4.1. 3-Glucosidierung	17
2.4.2. 5-Glucosidierung	17
2.4.3. Sambubiosidbildung	18
2.4.4. Acylierung bei Matthiola incana	18

Seite

2.4.5. Acylierung bei Callistephus chinensis 18

2.5. Chromatographie (DC und PC) 19

2.5.1. Laufmittel 19

2.5.2. R_f-Werte 19

2.6. HPLC 21

2.6.1. Probenvorbereitung 21

2.6.2. HPLC-Saeulen 21

2.6.3. Elutionsbedingungen 22

2.6.4. Retentionszeiten 25

2.7. Identifizierung der Reaktionsprodukte 27

2.8. Hydrolyse der Anthocyane 27

2.8.1. Kontrollierte saure Hydrolyse 27

2.8.2. Alkalische Hydrolyse 28

2.9. Anthocyanextraktion 28

2.10. Quantifizierung der Reaktionsprodukte 29

2.11. Proteinbestimmung 29

2.12. Isolierung von Flavonoiden und Anthocyanen 29

2.13. Chemikalien und Naturstoffe 32

2.14. Geraete 34

2.15. Abkuerzungen 34

3. ERGEBNISSE 36

3.1. 3-Glucosidierung 36

3.1.1. 3-Glucosidierung in Matthiola incana 37

3.1.1.1. Pflanzenmaterial 37
3.1.1.2. Enzymnachweis und Charakterisierung 38
3.1.1.3. Genetische Kontrolle 47

Seite

3.1.2. 3-Glucosidierung in Callistephus chinensis 50

3.1.2.1. Pflanzenmaterial 50
3.1.2.2. Nachweis des Enzyms 51
3.1.2.3. Genetische Kontrolle 53

3.2. 5-Glucosidierung 55

3.2.1. 5-Glucosidierung in Matthiola incana 55

3.2.1.1. Pflanzenmaterial 56
3.2.1.2. Nachweis und Charakterisierung des Enzyms 57
3.2.1.3. Verlauf der Enzymaktivitaet waehrend der Bluetenentwicklung 62
3.2.1.4. Genetische Kontrolle 64

3.2.2. 5-Glucosidierung in Callistephus chinensis 66

3.2.2.1. Pflanzenmaterial 66
3.2.2.2. Nachweis des Enzyms 67
3.2.2.3. Genetische Kontrolle 68

3.3. Xylosylierung in Matthiola incana 69

3.3.1. Pflanzenmaterial 69

3.3.2. Nachweis und Charakterisierung des Enzyms 70

3.3.3. Verlauf der Enzymaktivitaet waehrend der Bluetenentwicklung 77

3.3.4. Genetische Kontrolle 79

3.4. Acylierung 80

3.4.1. Acylierung in Matthiola incana 80

3.4.1.1. Pflanzenmaterial 83
3.4.1.2. Nachweis und Charakterisierung des Enzyms 83
3.4.1.3. Verlauf der Enzymaktivitaet waehrend der Bluetenentwicklung 87
3.4.1.4. Genetische Kontrolle 89

3.4.2. Acylierung in Callistephus chinensis 91

3.4.2.1. Pflanzenmaterial 91
3.4.2.2. Nachweis und Charakterisierung des Enzyms 91

Seite

4. DISKUSSION 97

4.1. Matthiola incana 98

4.1.1. 3-Glucosidierung 98

4.1.2. 5-Glucosidierung 105

4.1.3. Xylosylierung 107

4.1.4. Acylierung 110

4.1.5. Reihenfolge der einzelnen Reaktionsschritte in der Biosynthese 112

4.2. Callistephus chinensis 116

4.2.1. 3-Glucosidierung 116

4.2.2. 5-Glucosidierung 117

4.2.3 Acylierung 118

4.2.4. Reihenfolge der einzelnen Reaktionsschritte in der Biosynthese 120

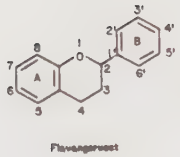
5. ZUSAMMENFASSUNG 122

6. LITERATURVERZEICHNIS 125

1. EINLEITUNG

Die Flavonoide sind eine weitverbreitete Gruppe pflanzlicher Pigmente, die am auffaelligsten in den Blueten akkumuliert sind. Durch die Faerbung der Blueten werden Insekten und Voegel angelockt, die fuer die Bestaeubung und Verbreitung von Samen sorgen und somit den Fortbestand der Art sichern. Ferner spielen sie als Strahlungs-, Infektions- und Frasschutz und moeglicherweise als Phytohormone eine Rolle. Allerdings ist das Vorkommen der Flavonoide nicht auf die Bluete beschraenkt, sondern schliesst auch andere Pflanzenorgane wie Blaetter, Stengel, Wurzeln und Fruechte ein.

Eingehende chemische, genetische, enzymologische Untersuchungen und solche mit isotopenmarkierte Vorstufen fuehrten dazu, dass die Flavonoide als die bestuntersuchte Stoffklasse des Sekundaerstoffwechsels angesehen werden koennen. Die Tatsache, dass die Flavonoide eine strukturell einheitliche Gruppe darstellen, vereinfachte ihre Untersuchungen gegenueber anderen sekundaeren Pflanzenstoffen wie z.B. den Alkaloiden betraechtlich. Die chemische Struktur der Flavonoide laesst sich vom C-15-Gerust des Flavans ableiten. Die Einteilung in verschiedene Klassen erfolgt nach dem Oxidationszustand des zentralen Pyranringes (Abb. 1). Die wichtigsten Flavonoidklassen sind die Flavanone, Dihydroflavonole, Flavone, Flavonole und Anthocyanidine.



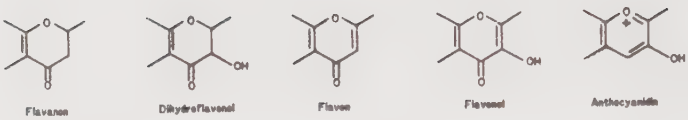


Abb. 1: Das Flavan-Grundgeruest und die wichtisten Flavonoidklassen

Modifikationen innerhalb einer Flavonoidklasse fuehren zu einer Vielzahl von Verbindungen. Die gaengigsten Modifikationsarten sind Hydroxylierung, Methylierung, Glycosylierung und Acylierung. Hydroxylierung und Methylierung finden hauptsaechlich am B-Ring, insbesondere in 3´-und 5´-Stellung, statt. Glycosidierung und Acylierung bevorzugen hingegen die 3-Stellung des Heterozyklus und die 5-bzw. 7-Stellung des A-Rings. Bei der Glycosidierung und Acylierung ist durch die Auswahl zwischen verschiedenen Zucker- bzw. Acylgruppen eine grosse Anzahl an Modifikationsmoeglichkeiten gegeben. Diese Anzahl erhoeht sich nochmals durch weitere Glycosidierung an schon vorhandenen Zuckermolekuelen und nicht direkt am Flavonoidgeruest.

Ausfuehrliche Untersuchungen mit isotopenmarkierten Vorstufen gaben Aufschluss sowohl ueber die Bausteine der Flavonoide als auch ueber den biogenetischen Zusammenhang der einzelnen Flavonoidklassen (Grisebach und Barz 1969). Als Bausteine, deren Kondensation zum C-15-Geruest der Flavonoide fuehrt, postulierten sie eine aktivierte Zimtsaeure (B-Ring) und drei Molekuele Malonyl-CoA (A-Ring). Das Enzym, welches diese Schluesselreaktion katalysiert, wurde erstmalig von Kreuzaler und Hahlbrock nachgewiesen (Kreuzaler und Hahlbrock 1972) und spaeter naeher charakterisiert (Kreuzaler und Hahlbrock 1975a und 1975b). Das erste Reaktionsprodukt dieser Kondensation ist das Chalkon, welches durch die Chalkon-Isomerase in das Flavanon ueberfuehrt wird (Kuhn et al. 1978, Suetfeld et al. 1978, Forkmann und Kuhn 1979, Forkmann und Dangelmayr 1980, Heller und Hahlbrock 1980, Spribille und Forkmann 1981, Suetfeld und Wiermann 1981, Britsch und Grisebach 1985). Das Schluesselenzym der Flavonoidbiosynthese ist somit die Chalkon-Synthase.

Die Flavanone werden von mehreren Enzymen als Substrat verwertet. Die Flavanon-3-Hydroxylase ueberfuehrt die Flavanone in die entsprechenden Dihydroflavonole (Forkmann et al.1980, Britsch et al. 1981, Forkmann und Stotz 1981, Forkmann und Stotz 1984, Froemel et al. 1985).

Durch die Flavanon-Oxidase werden die Flavanone zu den entsprechenden Flavonen oxidiert (Sutter et al. 1975, Stotz und Forkmann 1981, Britsch et al. 1981, Stotz et al. 1984).

Hydroxylierungen am B-Ring erfolgen durch die 3'-oder 3',5'-Hydroxylase, die sowohl die Flavanone als auch die Dihydroflavonole in die mehrfach hydroxylierten Verbindungen ueberfuehrt

(Fritsch und Grisebach 1975, Forkmann et al. 1980, Forkmann und Stotz 1981, Hagmann et al. 1983, Stotz et al. 1984).

Die Dihydroflavonole sind nun Ausgangsstoffe fuer drei Reaktionen. Die erste Reaktion stellt die Oxidation zu den Flavonolen dar (Britsch et al. 1981, Spribille und Forkmann 1984, Forkmann et al. 1986). Die zweite Reaktion betrifft die 3'-oder 3',5'-Hydroxylierung des B-Ringes (Forkmann und Stotz 1981, Stotz et al. 1985). Der dritte Reaktionsweg fuehrt ueber mehrere Schritte zu den Anthocyanidinen. Der erste Schritt dieser Kette stellt die Bildung der Flavan 3,4-Diole dar, die durch die Dihydroflavonol 4-Reduktase katalysiert wird (Heller et al. 1985a und 1985b). Der gesamte Ablauf der der Anthocyanbiosynthese ist in Abbildung 2 aufgezeichnet.

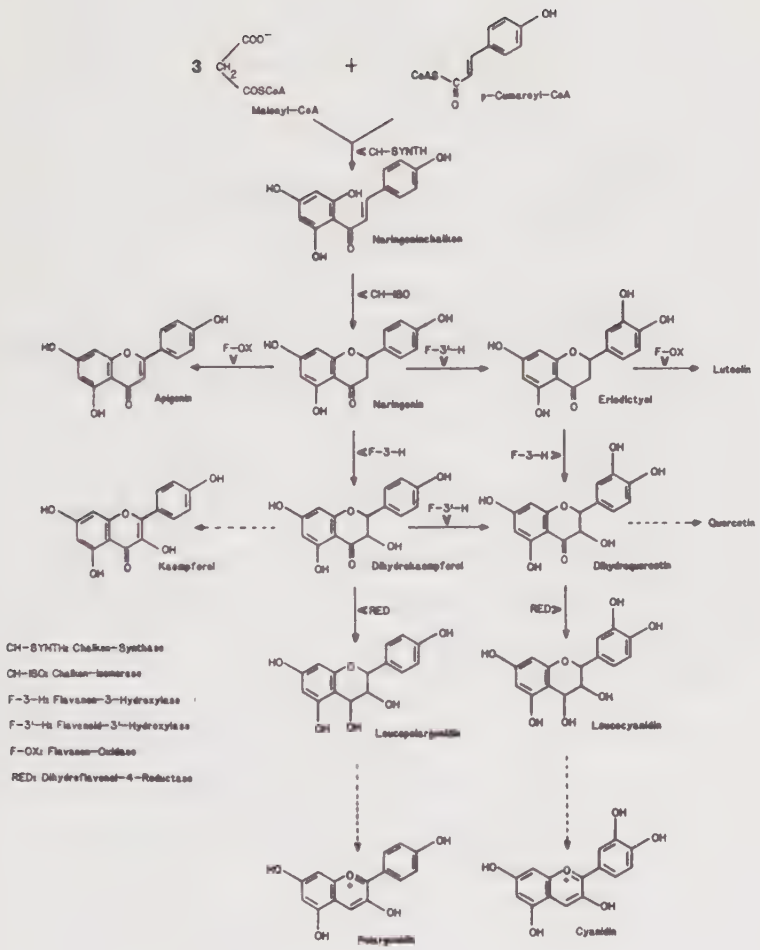


Abb. 2: Wahrscheinlicher Abblauf der Flavonoid-Biosynthese

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit beschaeftigen sich nicht mit der Synthese der Anthocyanidine selbst, sondern mit Reaktionen, die nach ihrer Bildung ablaufen. Diese Reaktion zaehlen mit Ausnahme der 3-Glucosidierung zu den Modifikationsreaktionen. Eines der letzten Zwischenprodukte der Flavonoidbiosynthese, das Anthocyanidin, zerfaellt leicht und muss stabilisiert werden. Das geschieht durch Glycosidierung, in den beiden zu untersuchenden Gattungen durch 3-Glucosidierung. In vielen Pflanzengattungen werden Anthocyanidin 3-Glucoside gefunden (Harborne 1967, Timberlake und Bridle 1976, Hrazdina 1982). Die Endprodukte der Anthocyanbiosynthese sind somit einfach glycosidierte Anthocyanidine. Anthocyanidine selbst wurden bisher in Inhaltsstoffanalysen nicht eindeutig gefunden, da sie unter physiologischen Bedingungen sehr instabil sind. Die Stabilisierung durch Glucosidierung muss also als letzter Schritt der Anthocyanbiosynthese selbst betrachtet werden und nicht als Modifizierungsreaktion.
Im Anschluss an die 3-Glucosidierung werden die Anthocyandin 3-Glucoside modifiziert. Aus Anthocyananalysen war bekannt, welche modifizierten Anthocyane in Matthiola incana (Seyffert 1960, 1962a, 1982) und Callistephus chinensis (Forkmann 1977b,Teusch 1984) vorliegen. Die Verbindungen sind in Abbildung 3 zusammengestellt.

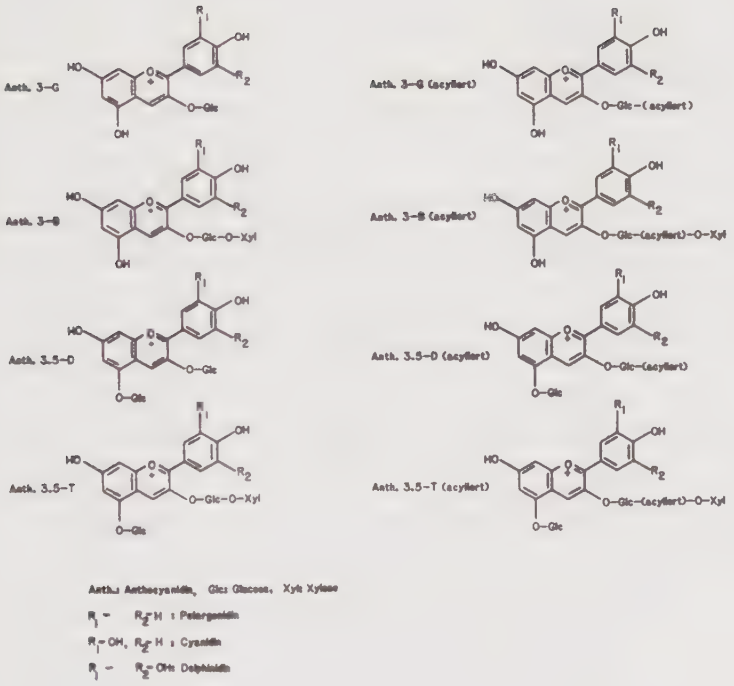


Abb. 3: Anthocyane, die in den Blueten von Matthiola incana und Callistephus chinensis vorkommen.

Anhand dieser Aufstellung ist ersichtlich, dass vier verschiedene Reaktionen zu charakterisieren sind:

1) 3-Glucosidierung
2) 5-Glucosidierung
3) Xylosylierung
4) Acylierung

Ziel dieser Arbeit war es, die Enzymologie der Glycosidierungs- und Acylierungsreaktionen, die zu den oben aufgefuehrten Anthocyanen fuehren, in Matthiola incana und Callistephus chinensis, mit Hilfe der HPLC-Technik aufzuklaeren, sowie deren genetische Kontrolle durch Verwendung genetisch definierter Linien zu bestimmen und die Reihenfolge der einzelnen Schritte in der Biosynthese festzulegen.

Als Ausgangspunkt fuer die Untersuchungen zur 3-Glucosidierung dienten Experimente, die mit radioaktiver UDP-Glucose durchgefuehrt worden waren (Dangelmayr 1982). Ferner gaben Charakterisierungen der 5-Glucosidierung in Petunia hybrida (Wiering 1973, Jonsson et al. 1984b), in Silene dioica (Kamsteeg et al. 1978b, 1980a) und der Acylierung in Silene dioica (Kamsteeg et al. 1980c) wertvolle Hinweise fuer die Untersuchungen an Matthiola incana und Callistephus chinensis.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Pflanzenmaterial

In die Untersuchungen wurden die Pflanzengattungen Matthiola incana und Callistephus chinensis einbezogen. Der Anbau der Pflanzen erfolgte im Gewaechshaus und waehrend der Sommermonate auf dem Versuchsfeld des Instituts.

Von Matthiola incana standen ganzjaehrig Blueten zur Verfuegung, da diese Gattung auch im Gewaechshaus blueht. Callistephus chinensis hingegen gelangte nur im Freiland fuer fuenf Wochen Anfang August zur Bluete.

Ihre Genetik wurde erstmals von Wit ausfuehrlich beschrieben (Wit 1937). Aufgrund langjaehriger Kreuzungsexperimente an unserem Institut standen von Callistephus chinensis 17 verschiedene definierte Genotypen zur Verfuegung. Die Linien unterscheiden sich in den Kombinationen von Genen, die die Anthocyanbiosynthese selbst oder die Anthocyanmodifikationen betreffen. Die genaue Genotypenbeschreibungen befindet sich im Ergebnisteil.

Von Matthiola incana standen ebenfalls zahlreiche definierte Linien zur Verfuegung. Ihre Genetik wurde von Kappert und Seyffert genau beschrieben (Kappert 1949, Seyffert 1960, 1962a, 1971). Die Genotypencharakterisierung ist auch hier im Ergebnisteil zu suchen.

2.2. Enzympraeparationen

2.2.1 Praeparation des Rohextraktes

Alle Schritte der Praeparation erfolgten bei 4 °C. Die Petalen wurden mit PVP, Quarz und Puffer in einer vorgekuehlten Reibschale in den folgenden Mengenverhaeltnissen homogenisiert:

1.0 g Petalen
1.0 g Quarz
0.5 g PVP (trocken)
6.0 (8.0) ml 0.1 M Kpi-Puffer (pH = 7.0) mit 5 mM 2-Mercaptoaethanol

Die Petalen von Matthiola incana wurden mit 6 ml Puffer aufgearbeitet, waehrend fuer die von Callistephus chinensis 8 ml verwendet wurden. Ansonsten war die Praeparation identisch.
Das Homogenat wurde in Eppendorf-Gefaesse ueberfuehrt und 10 min bei 10 000 x g zentrigufiert. Die Ueberstaende wurden vereinigt und nochmals bei 10 000 x g zentrifugiert. Bei der zweiten Zentrifugation reichten fuer die Extrakte von Matthiola 10 min aus, waehrend fuer Extrakte von Callistephus chinensis 15 min benoetigt wurden, um einen klaren Ueberstand zu erhalten. Der klare Ueberstand diente als Enzymquelle.

2.2.2. Gelfiltration des Rohextraktes

Um den Rohextrakt von Anthocyanen und anderen niedermolekularen Substanzen zu reinigen, wurde der Extrakt ueber eine Sephadex G-

50-Saeule gegeben. Als Saeulen fuer diese Gelfiltration dienten Pasteurpipetten mit einem Bettvolumen von 1 ml. Die Saeulen konnten mit maximal 0.45 ml Rohextrakt beladen werden. die Proteinloesung wurde mit 0.45 ml Extraktionsbuffer eluiert.

2.2.3. Mikrosomenpraeparation

Zur Herstellung des Rohextraktes wurden folgende Mengen benoetigt:

5.0 g Petalen
2.5 g Quarz
2.5 g PVP
25 ml 0.1 m Kpi-Puffer (pH = 7.0) mit 2.8 mM 2-Mercapto-aethanol

Alle Arbeiten erfolgten bei 4° C. Die Petalen wurden in einer vorgekuehlten Reibschale mit Quarz, PVP und Puffer homogenisiert. Das Homogenat wurde anschliessend bei 12 000 x g 20 min zentrifugiert und der Ueberstand durch Glaswolle abfiltriert. Von diesem Rohextrakt wurde 1 ml Loesung als Vergleich behalten, waehrend der Rest zur Praeparation der Mikrosomen diente. Dazu wurde der Ueberstand mit 1 M $MgCl_2$-Loesung versetzt und zwar in dem Mengenverhaeltnis 0.03 ml 1 M $MgCl_2$-Loesung pro 1 ml Rohextrakt. Nach vorsichtigem Schwenken wurde das Ganze 10 min im Eisbad belassen und anschliessend 20 min bei 17 000 x g zentrifugiert (Diesperger et al. 1974). Der Ueberstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet, welches das mikrosomale Sediment darstellt, in 1/20 des Faellvolumens suspendiert. Die Suspension wurde in

einen Glashomogenisator ueberfuehrt und vorsichtig homogenisiert. Dieses Homogenisat wurde als mikrosomaler Enzymextrakt verwendet.

2.2.4 $(NH_4)_2SO_4$-Faellung

Die Herstellung des Rohextraktes erfolgte in den folgenden Mengenverhaeltnissen:

5.0 g Petalen
5.0 g Quarz
2.5 g PVP
30 mg Natriumascorbat
25 ml Tris/HCl-Puffer (pH = 7.5) mit 0.01 ml Glycerin
(Puffer wurde erhitzt und mit Stickstoff gesaettigt)

Wiederum erfolgte die Praeparation bei 4° C. Die Petalen wurden zusammen mit den aufgefuehrten Substanzen in einer vorgekuehlten Reibschale gemoersert. Das Homogenat wurde bei 12 000 x g 20 min zentrifugiert. Der Ueberstand ueber Glaswolle gefiltert. Dieses Filtrat wurde als Rohextrakt verwendet. Von ihm wurden 0.5 ml als Vergleich belassen. Die Ammoniumsulfat-Faellung erfolgte dann in zwei Schritten. Der erste Schritt bestand aus einer portionsweisen Zugabe von festem Ammoniumsulfat bis zu einem 40%-igen Gehalt an Salz im Rohextrakt innerhalb von 20 min. Die Zugabe erfolgte unter staendigem Ruehren. Anschliessend wurde 20 min bei 18 000 x g zentrifugiert. Im zweiten Schritt wurde zum Ueberstand der Zentrifugation unter Ruehren in 20 min wiederum Ammoniumsulfat zugegeben bis eine 80% ige Salzkonzentration erreicht war. Anschliessend wurde 15 min bei 18 000 x g zentrifugiert. Das

Pellet wurde in 0.1 M Imidazol/HCl-Puffer (pH = 6.5), der 10% Glycerin und 20 mM Natriumascorbat enthielt, geloest. Diese Suspension diente als Enzymquelle.

2.3 Parameterabhaengigkeit

Zur Optimierung der Enzymtests wurde deren Abhaengigkeit von verschiedenen Parameter ueberprueft.

2.3.1 Zeitlinearitaet

Zur Ermittlung der Abhaengigkeit der Enzymreaktion von der Zeit wurden die Reaktionsansaetze 1-60 min inkubiert.

2.3.2 Proteinabhaengigkeit

Zu dieser Bestimmung wurde der Reaktionsansatz, dessen Volumen immer 0.1 ml betrug, 0.005-0.095 ml Enzymextrakt zugesetzt. Diese Volumina entsprechen einem Proteingehalt von 0.01-0.19 mg bei Matthiola incana und bei Callistephus chinensis 0.001-0.02 mg. Das fehlende Volumen wurde durch Puffer ergaenzt.

2.3.3. pH-Abhaengigkeit

Zur Bestimmung der pH -Optima wurde das Verhaeltnis Enzymextrakt zu Puffer moeglichst klein gewaehlt, um eine pH-Verschiebung zu vermeiden. Die Messung erfolgte in je 0.1 ml Testvolumen, das sich aus Anthocyan, welches zur Trockene einrotiert war, 0.085-0.09 ml Puffer, 0.005-0.01 ml Enzymextrakt und 0.005 ml UDP-Glucose,-Xylose bzw. CoA-Ester-Loesung zusammensetzte. Als Puffer wurden 0.1 M Kpi (pH = 5.5-8.5), 0.1 M Glycin/NaOH (pH = 7.5-10.5), 0.1 M Tris/HCl (pH = 7.5-9.0) und Britton-Robinson I (pH = 5.0-10.0) verwendet (Rauen 1967).

2.3.4 Temperaturabhaenigkeit

Zur Ermittlung der Temperaturabhaenigkeit wurde der Reaktionsansatz ohne UDP-Glucose bzw. UDP-Xylose oder CoA-Ester und ohne Enzymextrakt bei der entsprechenden Temperatur fuer 5 min belassen, um sicher zu stellen, dass die Loesung die geforderte Temperatur aufwies. Dann wurde durch Enzym-und Substratzugabe die Reaktion gestartet und bei Temperaturen zwischen 0°C und 80°C inkubiert.

2.3.5. Abhaengigkeit von der Substratkonzentration

2.3.5.1. Abhaengigkeit von UDP-Glucose, UDP-Xylose und CoA-Ester

Um diese Abhaenigkeit zu bestimmen, wurde der aktivierte Zucker bzw. CoA-Ester in dem Puffer geloest, der auch fuer den Reaktionsansatz benutzt wurde. Die Summe aus zugegebenem Puffer und Substrat-Loesung war immer gleich. Das Gesamtvolumen von 0.1 ml bestand aus Anthocyan, das zur Trockene einrotiert war, 0.02 ml Enzymextrakt und die restlichen 0.07-0.08 ml setzten sich aus Puffer- und Substratloesung zusammen.

2.3.5.2. Abhaengigkeit von der Anthocyankonzentration

Die entsprechenden Anthocyanmengen wurden in ein Eppendorfgefaess gefuellt und zur Trockene eingedampft. Die uebrigen Mengen entsprachen dem jeweiligen optimierten Enzymtest und wurden zugefuegt.

2.3.6. Stabilitaet des Enzyms

Zur Bestimmung der Enzymstabilitaet bei einer Lagerung bei -20° C wurden die eingefrorenen Extrakte in regelmaessigen Zeitabstaenden von 1 Tag bis mehreren Monaten zu Enzymtests benutzt. Die gebildete Produktmenge im Vergleich mit dem frisch praeparierten Enzymextrakt galt als Stabilitaetsmass.

Um die Stabilitaet des Enzyms bei einer Temperatur in Abhaengigkeit von der Zeit zu messen, wurde der Enzymextrakt unterschiedlich lange einer bestimmten Temperatur ausgesetzt (1-60 min). Anschliessend wurde die Reaktion wie unter Kap.2.4 durchgefuehrt. Auch hier galt die gebildete Produktmenge als Mass fuer die Stabilitaet.

2.3.7. Einfluss von Ionen und Hemmstoffen

Der Einfluss von Hemmstoffen und Ionen auf die Enzymreaktion wurde in 0.1 ml Volumen getestet, wobei die Salze bzw. Hemmstoffe in 0.01 ml Loesung zugefuegt wurden. Diese 0.01 ml wurden von der Puffermenge abgezogen, waehrend die uebrigen Mengen unveraendert blieben.

2.3.8. Substratspezifitaet

Bei der Bestimmung der Substratspezifitaet wurde lediglich ein Substrat im Testgemisch veraendert, das zweite Substrat und die uebrigen Mengen blieben unveraendert.

2.4. Optimierte Enzymtests

Die optimierten Testbedingungen fuer die verschiedenen Enzymreaktionen setzten sich wie folgt zusammen:

2.4.1. 3-Glucosidierung

Das Gesamtvolumen des Tests betrug 0.1 ml. Es setzte sich aus 0.005 ml (30 nmol) Anthocyanidin bzw. Flavonol, geloest in EGME, 0.01 ml Enzymextrakt (0.02 mg Protein), 0.005 ml (70 nmol) UDP-Glucose und 0.08 ml 0.05 M Kpi-Puffer (pH = 7.0) zusammen. Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe von Anthocyanidin bzw. Flavonol. Nach einer Inkubationszeit von 3 min bei 30°C wurden zur Beendigung 0.1 ml $CHCl_3$: MeOH (0.5% HCl) = 2 : 1 zugegeben, was zu einer Phasentrennung fuehrte (Folch et al. 1957). Die obere Phase enthielt die Anthocyane. Von ihr wurde jeweils 0.05 ml in die HPLC eingespritzt oder die gesamte Phase auf DC-Platte aufgetragen.

Bei den radioaktiven Tests wurde ^{14}C-markierte UDP-Glucose eingesetzt (70 nmol = 1850 Bq).

2.4.2. 5-Glucosidierung

Das Reaktionsvolumen betrug 0.1 ml. Es setzte sich aus Cyanidin 3-sambubiosid (30 nmol), 0.005 ml (700nmol) UDP-Glucose, 0.03 ml Enzymextrakt (0.03 mg Protein) und 0.065 ml 0.05 M Kpi zusammen. Durch UDP-Glucose-Zugabe wurde die Reaktion gestartet, die Dauer betrug 10 min bei 30°C. Die Reaktion wurde wie unter 2.4.1. beendet und analysiert.

2.4.3. Sambubiosidbildung

Das Testvolumen von 0.1 ml setzte sich aus zur Trockene eingedampften Cyanidin 3-Glucosid (40 nmol), 0.02 ml (0.02 mg) Enzymloesung, 0.005 ml (160 nmol) UDP-Xylose und 0.075 ml 0.05 M Kpi (pH = 6.5) zusammen. Durch UDP-Xylose-Zugabe wurde die Reaktion gestartet und nach 10 min Inkubationszeit bei 25°C durch Zusatz von 0.05 ml $CHCl_3$: MeOH (0.5% HCl) = 2 : 1 beendet (Folch et al. 1967). Von der oberen Phase wurden 0.05 ml durch HPLC und DC in 15% HOAc und HOAc-HCl analysiert.

2.4.4. Acylierung in Matthiola incana

In den 0.1 ml Gesamtvolumen waren 30 nmol Cyanidin 3-Sambubiosid, 20 nmol CoA-Ester , 0.02 ml (0.02 mg Protein) Enzymloesung und 0.075 ml 0.05 M Kpi (pH = 7.0) enthalten. Das Reaktionsgemisch wurde bei 30°C inkubiert. Nach 10 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 0.05 ml $CHCl_3$: MeOH (0.5% HCl) = 2 : 1 (Folch partition) gestoppt. Die obere Phase wurde durch HPLC und DC in BAW, 15% HOAc und EtOAc-HCOOH analysiert.

2.4.5. Acylierung in Callistephus chinensis

Der Testansatz enthielt in einem Gesamtvolumen von 0.1 ml: 50 nmol Pelargonidin 3-Glucosid, 0.005 ml (75 nmol) Malonyl-CoA, 0.02 ml (0.003 mg Protein) Enzymloesung und 0.075 ml 0.05 M Kpi-Puffer (pH = 7.0). Nach zehnminuetiger Inkubation bei 30°C wurde die Reaktion durch Zufuegen von $CHCl_3$: MeOH (0.5% HCl) = 2 : 1 gestoppt und durch HPLC und DC in BAW analysiert.

2.5. Chromatographie (DC und PC)

Die Duennschicht-Chromatographie (DC) der Anthocyane wurde auf 0.1 mm dicken Cellulose-Platten (G 1440) der Firma Schleicher & Schuell (Dassel) oder 0.1 mm dicken Kieselgel-Platten der Firma Merck (Darmstadt) durchgefuehrt.
Die Papierchromatographie (PC) erfolgte auf Cellulose (Schleicher & Schuell 2043 oder Whatmann 3MM).

2.5.1. Laufmittel

Folgende Laufmittel wurden sowohl fuer PC (Cellulose) als auch fuer DC (Cellulose) benutzt:

Angaben in Volumenprozent

30% HOAc = 30% Essigsaeure

15% HOAc = 15% Essigsaeure

H_2O - HOAc - HCl = Wasser - Essigsaeure - Salzsaeure (82-15-3)

BAW = n-Butanol - Essigsaeure - Wasser (6-1-2)

Bei Verwendung von Kieselgel-Platten wurde mit folgenden Laufmitteln gearbeitet:

Bu - HCl = n-Butanol - 2N HCl (1-1)

EtOAc - HCOOH = Aethylacetat - Ameisensaeure - H_2O (70-15-15)

2.5.2 R_f-Werte

Die durchschnittlichen R_f -Werte aller an den Enzymreaktionen beteiligten Anthocyane sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: R_f -Werte (x 100) der Flavonoide in den verschiedenen Laufmitteln

Substanz	Laufmittel				
	15% HOAc	BAW	HOAc - HCl	Bu - HCl	EtOAc - HCOOH
Cy	-	-	4.8	-	-
Cy 3-G	21	23	17	13	58
Cy 3-B	44	21	45	14	38
Cy 5-G	-	-	18	19	-
Cy 3.5-D	-	9	29	8	-
Cy 3.5-T	-	6	64	5	-
Cy 3-(p-C)-G	9	54	-	-	70
Cy 3-(Kaf)-G	12	49	-	-	64
Cy 3-(p-C)-B	26	47	-	-	-
Cy 3-(Kaf)-B	29	44	-	-	53
Pq 3-G	-	36	28	-	-
Pg 3-(Mal)-G	-	44	-	-	-

Abkuerzungen siehe Kap. 2.15.

2.6. HPLC

Die HPLC-Anlage bestand aus einem Loesungsmittelfoerdersystem (SP 8700) und einem Integrator (SP 4270) der Firma Spectra Physics, einem Detektor der Firma Knauer und einem Fraktionssammler (Frac-100) von Pharmacia.

2.6.1. Probenvorbereitung

Zur HPLC-Trennung wurde die oberste Phase der Folch-Verteilung abzentrifugiert, so dass keine Feststoffe enthalten waren. Anthocyanextrakte, die aus einer Loesung von MeOH / 1% HCl bestanden, wurden zur Trockene eingeengt, in MeOH geloest, bei 10 000 x g abzentrifugiert und dann erst durch die HPLC analysiert. Extrakte aus einem Gemisch von MeOH / 0.1% HCl konnten hingegen nach der Zentrifugation direkt auf die Saeule gebracht werden, da hier der Saeure-Anteil gering genug war. Salzsaeure schadet dem Saeulenfuellmaterial und den Stahlkapillaren. Die zu analysierende Loesung sollte keinerlei Feststoffe enthalten, da sonst die Trennung selbst und die Lebensdauer der HPLC-Saeule beeintraechtigt werden.

2.6.2. HPLC-Saeulen

Bei allen analytischen Saeulen wurde eine Vorsaeule mit einer Laenge von 10 mm und einem Innendurchmesser von 4.6 mm vor die eigentliche Trennsaeule geschaltet. Aufgabe der Vorsaeule war es, eventuel noch vorhandene Feststoffe von der Trennsaeule fernzuhalten. Die Fuellung der Vorsaeule bestand aus Spherisorb ODS II (RP 18) mit der Korngroesse von 0.005 mm (Eischoff, Leonberg).

Als analytische Saeulen wurden zwei verschiedene verwendet:

Saeule I wies eine Laenge von 125 mm und einen Innendurchmesser von 4.6 mm auf. Das Traegermaterial bestand aus Spherisorb ODS II (RP 18) mit der Korngroesse von 0.003 mm (Bischoff, Leonberg). Saeule II besass eine Laenge von 250 mm und einen Innendurchmesser von 4.6 mm. Die Fuellung bestand aus dem gleichem Material wie bei Saeule I, jedoch betrug die Korngroess 0.005 mm.
Die Trennung von praeparativen enzymatischen Ansaetzen wurde mit einer semi-praeparativen Saeule (Saeule III), deren Laenge 250 mm und deren Innendurchmesser 9.0 mm betrug, durchgefuehrt. Das Traegermaterial bestand aus Spherisorb ODS II (RP 18) mit der Korngroesse 0.005 mm. Alle Saeulen wurden von der Firma Bischoff (Leonberg) bezogen.

2.6.3. Elutionsbedingungen

Fuer die Trennung der Anthocyane wurde ein Elutionssystem verwendet, dass sich aus zwei Loesungen (A + B = 100%) zusammensetzte. Je nach Trennproblem wurde der Gradient veraendert.

Elutionssystem I

A = 1.5% Phosphorsaeure in Acetonitril

B = 0.5% Phosporsaeure in Wasser

In Abbildung 4 sind die Gradienten fuer die unterschiedlichen Trennungen aufgezeichnet, wobei jeweils der prozentuale Anteil von Loesung A in Abhaengigkeit von der Zeit aufgetragen ist.

von Loesung A in Abhaengigkeit von der Zeit aufgetragen ist.

Bei Gradient 2 wurde die Saeule I verwendet, die Flussrate betrug 1.5 ml/min.

Bei den Gradienten 1, 3, 4 und 5 wurde die Saeule II benutzt mit der gleichen Flussrate wie bei Saeule I.

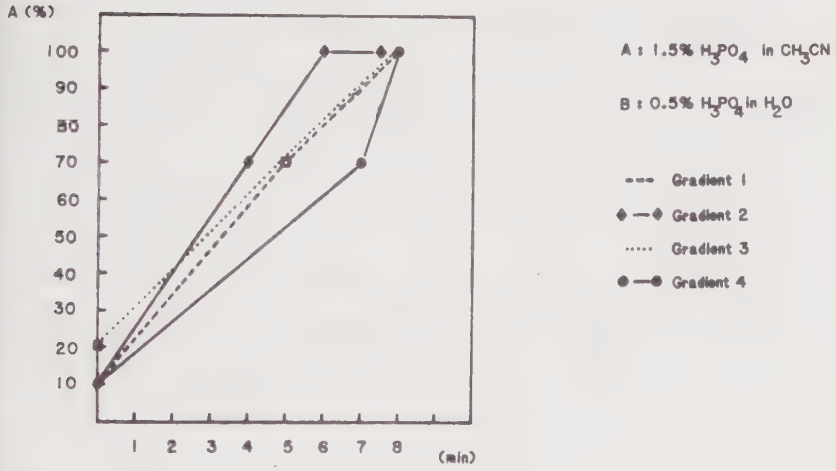


Abb. 4: Gradienten 1 - 5 des Elutionssystems I

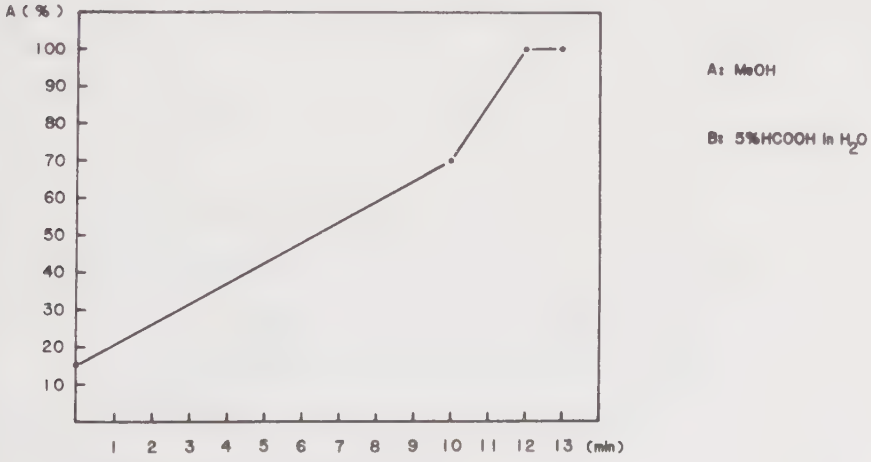


Abb. 5: Gradient des Elutionssystems II

Fuer die Trennung der Flavonole und deren 3-Glucoside wurde ein anderes Elutionssystem gewaehlt, das sich aus den folgenden zwei Loesungen A + B = 100% zusammensetzte:

Elutionssystem II

A = Methanol

B = 0.5% Ameisensaeure in Wasser

In Abbildung 5 ist der Gradient 6 aufgezeichnet, der fuer diese Trennung benutzt wurde.

Es wurde mit Saeule I bei einer Flussrate von 0.7 ml / min gearbeitet.

Nach der enzymatischen Synthese der Flavonol 3-Glucoside wurde das Reaktionsgemisch durch die semi-praeparative Saeule (Saeule III) getrennt. Fuer diese Trennung war es jedoch erforderlich, den Gradienten des Elutionssystem II wie folgt zu veraendern:

Zeit (min.)	Anteil A / B (Prozent)
0.0	30 / 70
3.0	70 / 30
4.0	100 / 0
6.0	100 / 0

Fuer die Trennung von Quercetin und dessen 3-Glucosid wurde ein Fluss von 2 ml / min. und fuer die von Kaempferol und dessen 3-Glucosid ein Fluss von 3 ml / min verwendet.

Die gesamten Analysen erfolgten bei Raumtemperatur.

2.6.4. Retentionszeiten

In Tabelle 2 sind die Retentionszeiten der Flavonoide bei den verschiedenen Gradienten zusammengefasst.

Tabelle 2: Retentionszeiten der Flavonoide

Substanz	Retentionszeit (min)					
	1	2	3	4	5	6
Cy 3-G	5.1	5.4	3.7	5.5	3.9	-
Cy 3-B	5.0	-	4.1	5.3	3.3	-
Cy 3.5-D	4.7	-	-	4.9	-	-
Cy 3.5-T	4.6	-	-	4.8	-	-
Cy 3-(p-C)-G	-	-	5.7	6.7	5.9	-
Cy 3-(Kaf)-G	-	-	5.3	-	5.6	-
Cy 3-(Sin)-G	-	-	5.6	-	-	-
Cy 3-(p-C)-B	6.1	-	5.3	6.1	5.6	-
Cy 3-(Kaf)-B	-	-	5.0	-	5.3	-
Cy 3-(Sin)-B	-	-	5.2	-	-	-
Cy 3-(Mal)-G	-	-	-	6.0	4.6	-
Cy 3-(Suc)-G	-	-	-	-	4.8	-
Cy 3-(Glu)-G	-	-	-	-	4.8	-
Cy 3-(MMa)-G	-	-	-	-	4.8	-
Cy 3-(p-C)-5-D	-	-	-	6.2	-	-
Cy 3-(p-C)-5-T	5.4	-	-	6.0	-	-
Pg 3-G	-	5.9	5.1	-	4.2	-
Pg 3-B	-	-	4.8	-	-	-
Pg 3-(Mal)-G	-	-	-	-	4.8	-

Fortsetzung von Tabelle 2:

Substanz	Retentionszeit (min)					
	1	2	3	4	5	6
Pg 3-(Suc)-G	-	-	-	-	5.1	-
Pg 3-(Glu)-G	-	-	-	-	5.1	-
Pg 3-(MMa)-G	-	-	-	-	5.1	-
Dp 3-G	-	5.0	-	5.2	3.0	-
Dp 3-(p-C)-G	-	-	-	6.8	-	-
Dp 3-(Mal)-G	-	-	-	5.8	4.1	-
Dp 3-(Suc)-G	-	-	-	-	4.4	-
Dp 3-(Glu)-G	-	-	-	-	4.5	-
Dp 3-(MMa)-G	-	-	-	-	4.5	-
Pg	-	7.8	-	-	-	-
Cy	-	7.1	-	-	-	-
Dp	-	6.0	-	-	-	-
Qu	-	-	-	-	-	13.6
Qu 3-G	-	-	-	-	-	11.4
Km	-	-	-	-	-	14.8
Km 3-G	-	-	-	-	-	12.3
Ap	-	-	-	-	-	15.4
Lu	-	-	-	-	-	14.3

Abkuerzungen s. Kap. 2.15

1 = Gradient 1

2 = Gradient 2

3 = Gradient 3

4 = Gradient 4

5 = Gradient 5

6 = Gradient 6

2.7. Identifizierung der Reaktionsprodukte

Das Reaktionsgemisch wurde durch die HPLC-Saeule mit dem entsprechenden Gradienten getrennt. Die Retentionszeiten der einzelnen Peaks wurden mit denen der passenden Referenzsubstanzen verglichen. Die Trennung der Anthocyane wurde bei 530 nm, die der Flavone und Flavonole bei 350 nm und die der uebrigen Flavonoide bei 290 nm detektiert. Zur Detektion wurde ein Spektralphotometer der Firma Knauer verwendet. Die Retentionszeiten wurden von einem Integrator (SP 4270, Spectra Physics) direkt angegeben. Ferner wurde das Reaktionsgemisch direkt auf DC-Platten gegeben, in verschiedenen Laufmitteln mit den entsprechenden Referenzen chromatographiert. Zusaetzlich wurde die HPLC-Trennung fraktioniert und die entsprechenden Fraktionen duennschicht-chromatographisch mit den geeigneten Referenzen untersucht.
UV-VIS-Spektren zwischen 200 nm und 600 nm unterstuetzten die Identifizierung der Reaktionsprodukte. Das erhaltene Spektrum wurde mit Literaturwerten verglichen (Harborne 1967). Zur eindeutigen Identifizierung wurde das Reaktionsprodukt zeitlich kontrolliert abgebaut (s. Kap. 2.8). Die Analyse erfolgte durch HPLC und auf Cellulose-Platten in H_2O - HOAc - HCl.

2.8. Hydrolyse der Anthocyane

2.8.1 Kontrollierte saure Hydrolyse

Die zur Trockene einrotierten Anthocyane wurden in 0.1 ml MeOH geloest, mit der gleichen Menge 2 N HCl versetzt und im Dunkeln

bei 95°C hydrolysiert. Nach 5, 10, 20 und 30 min wurden je 0.03 ml Probe entnommen und auf Cellulose-Platten aufgetragen oder auf die HPLC gegeben. Das verbleibende Restvolumen wurde ebenfalls analysiert. Die Duennschichtchromatographie erfolgte in BAW und H_2O - HOAc - HCl.

2.8.2. Alkalische Hydrolyse

Der zur Trockene eingeengten acylierten Anthocyane wurden in 0.1 ml MeOH geloest und 0.1 ml 10% KOH zugefuegt. Nach Zugabe von KOH wurde mit Stickstoff ueberschichtet und eine Stunde bei Raumtemperatur hydrolysiert. Dann wurde mit wenig 2N HCl angesaeuert und das Gemisch zur Extraktion der Saeuren mit 3 x 0.1 ml Diaethylaether ausgeschuettelt. Der Aetherextrakt wurde zur Trockene eingeengt, mit MeOH versetzt und zur Analyse auf Cellulose-Platten aufgetragen und in 15% HOAc zusammen mit Vergleichssaeuren chromatographiert.

Zur Extraktion der Anthocyane wurde das Reaktionsgemisch mit 3 x 0.1 ml Isoamylalkohol ausgeschuettelt. Auch dieser Extrakt wurde zur Trockene eingeengt, in MeOH geloest und durch HPLC und DC in BAW und H_2O - HOAc - HCl analysiert.

2.9. Anthocyanextraktion

Die Anthocyane wurden mit MeOH / 1% HCl oder MeOH / 0.1% HCl nach der Methode von Forkmann und Seyffert extrahiert (Forkmann und Seyffert 1972).

Zur Anthocyanextraktion der verschiedenen Bluetenstadien wurden 0.1 g Petalen von acht unterschiedlichen Stadien (Dangelmayr et

al. 1983) einzeln mit je 1 ml MeOH / 0.1% HCl fuer 24 h extrahiert.

2.10. Quantifizierung der Reaktionsprodukte

Die quantitative Auswertung erfolgte durch den automatischen Integrator (SP 4270, Spectra Physics), indem die Flaeche der einzelnen Peaks einer Trennung berechnet wurden. Durch Vergleich mit einer Eichkurve, in der die berechnete Flaeche als Funktion von nmol Anthocyan aufgezeichnet war, konnten die gebildeten nmol Produkt bestimmt werden. Voraussetzung war jedoch, dass die Eichkurve bei der gleichen Wellenlaenge aufgenommen war wie die Trennung des Reaktionsgemischs. Die Trennungen der Anthocyane in der vorliegenden Arbeit wurden immer bei 530 nm detektiert.

2.11. Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes in den Enzymextrakten wurde nach der Methode von Bradford durchgefuehrt (Bradford et al. 1976).

2.12. Isolierung von Flavonoiden und Anthocyanen

Die im Handel nicht erhaeltlichen Vergleichssubstanzen wurden aus Blueten verschiedener Pflanzen gewonnen. Zur Isolierung von Cy 3.5-D, Cy 3.5-T, Pg 3.5-D und Pg 3.5-T wurde der betreffende Bluetenextrakt auf Cellulose Papier (Whatmann 3MM) in BAW chroma-

tographiert. In 30% HOAc wurde chromatographiert , um die 3-Glucoside und die 3-Sambubioside zu isolieren. Nachdem das Papier getrocknet war, wurden die bestimmten Banden ausgeschnitten und mit MeOH eluiert. Das Eluat, welches das Anthocyan enthielt, wurde eingeengt und die Reinheit durch HPLC bestimmt. Gegebenenfalls wurden die Substanzen noch durch die HPLC-Saeule gereinigt und erst dann eingesetzt. Zur Isolierung der acylierten Verbindungen wurde der Bluetenextrakt auf DC-Platte in BAW chromatographiert. Nachdem die Platte getrocknet war, wurde die betreffende Bande ausgekratzt, das Traegermaterial in mit Watte gestopfte Pasteurpipetten gefuellt und mit MeOH so lange eluiert bis die Cellulose keine Faerbung mehr aufwies. Die Loesung wurde eingeengt und die Reinheit durch HPLC geprueft.

Als weitere nicht im Handel erhaeltlichen Flavonoide standen DHK und Nar 7-G aus Matthiola incana Linie 09 zur Verfuegung (Forkmann 1979).

Die Verbindungen, die aus Matthiola incana und Callistephus chinensis isoliert wurden, sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Anthocyane und Flavonoide, die aus Matthiola incana und Callistephus chinensis isoliert wurden

Pflanze	Linie	Anthocyan
M. incana	08	Cy 3-B und Cy 3-G
"	07	Cy 3.5-D und Cy 3.5-T
"	06	Cy 3-B und Cy 3-G (acyliert mit p-C oder Kaf)
"	16	Pg 3-B und Pg 3-G
"	15	Pg 3.5-D und Pg 3.5-T
C. chinensis	04	Dp 3-G

2.13. Chemikalien und Naturstoffe

Mit Ausnahme der unten aufgefuehrten Reagenzien stammten alle weiteren Chemikalien von Merck, Darmstadt und hatten p.a.Qualitaet.

Merck, Darmstadt: Acetonitril fuer Chromatographie
Methanol fuer Chromatographie

Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala: Sephadex G-50

Roth, Karlsruhe: Apigenin
Cyanidinchlorid
Delphinidinchlorid
Dihydroquercetin
Kaempferol
Kaffeesaeure
Luteolin
Naringenin
p-Cumarsaeure
Pelargonidinchlorid
Paeonidinchlorid
Quercetin

Sarsyntex, Merignac: Eriodictyol
Eriodictyol 7-Glucosid

Serva Feinbiochemika GmbH & Co, Heidelberg: Serva-Blue G-250
2-Mercaptoaethanol
DPC
EDTA
PVP

Sigma, St. Louis: ADP-Glucose

CDP-Glucose

GDP-Glucose

TDP-Glucose

UDP-Glucose

UDP-Xylose

UDP-Galaktose

UDP-Glucuronsaeure

UDP-Mannose

Acetyl-CoA

n-Propionyl-CoA

Malonyl-CoA

Methylmalonyl-CoA

Succinyl-CoA (Na-Salz)

Glutaryl-CoA (Li-Salz)

p-Chloromercuribenzoat

Die CoA-Ester der nachfolgenden Saeuren wurden von Dr.W.Heller (Freiburg) freundlicherweise zur Verfuegung gestellt:

Ferulasaeure

Isoferulasaeure

Kaffeesaeure

p-Cumarsaeure

p-Methoxyzimtsaeure

Sinapinsaeure

Zimtsaeure

2.14. Geraete

Knauer : Spektralphotometer Typ 8700

Kontron : Spektralphotometer Uvikon 820

Pharmacia : Fraktionssammler Frac-100

Spectra Physics: Loesungsmittelfoerderungsystem SP 8700

Rechner-Integrator SP 4270

Aufbaumodul SP 8750

Rheodyne : Einspritzventil und Einspritzschleifen

2.15. Abkuerzungen

ADP : Adenosin 5´-diphospho-

Ap : Apigenin

B : Sambubiosid

CDP : Cytosin 5´-diphospho-

Cy : Cyanidin

D : Diglucosid

DC : Duennschicht-Chromatographie

DHQ : Dihydroquercetin

DDC : Diaethyldithiocarbamat

Dp : Delphinidin

DPC : Diaethylpyrocarbonat

EDTA : Aethylendiamintetraessigsaeure

EGME : Aethylenglycolmonoaethylaether

Eri : Eriodictyol

E. S. : Entwicklungsstadium

G : Glucosid

GDP : Guanosin-5´-diphospho-

Glu : Glutaroyl

HOAc : Essigsaeure

HPLC : High Performance Liquid Chromatography

Kaf : Kaffeoyl

Km : Kaempferol

Kpi : Kaliumphosphat-Puffer

Lu : Luteolin

Mal : Malonyl

MeOH : Methanol

min : Minuten

MMa : Methylmalonyl

Nar : Naringenin

p-C : p-Coumaroyl

p-CMB : p-Chloromercuribenzoat

Pg : Pelargonidin

Pn : Paeonidin

PVP : Polyvinylpyrrolidon

Qu : Quercetin

R_f : relative Wanderstrecke

RP : reverse phase

R_t : Retentionszeit

Sin : Sinapoyl

Suc : Succinyl

T : 3-Sambubiosid-5-Glucosid

TDP : Thymidin 5´-diphospho-

Tris : Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

UDP : Uridin- 5´-diphospho-

3. ERGEBNISSE

3.1. 3-Glucosidierung

Wegen ihrer grossen Instabilitaet und Unloeslichkeit kommen die Anthocyanidine nur als Glycoside in der Pflanze vor und nie als Aglykon. Eines der einfachsten Glycoside ist das 3-Glucosid, das als Substrat fuer weitere Modifikationen wie Glycosidierung an weiteren Positionen oder Acylierung verwertet werden kann. Die 3-Glucoside entstehen aus den Anthocyanidinen durch Uebertragung des Glucosemolekuels von UDP-Glucose auf die OH-Gruppe in 3-Stellung. Das fuer diese Reaktion verantwortliche Enzym, die 3-Glucosyltransferase (3 GT), konnte erstmalig in Zea mays nachgewiesen werden (Larson 1971, Larson und Longergan 1973, Larson und Coe 1977, Dooner und Nelson 1977). Spaeter wurde sie auch in Bluetenblaettern von Silene dioica (Kamsteeg et al. 1978a), von Petunia hybrida (Kho et al. 1978, Gerats et al. 1983), von Matthiola incana (Dangelmayr 1982), von Callistephus chinensis (Seyffert 1982), in Zellkulturen von Happlopappus gracilis (Saleh et al. 1976a), in Keimlingen von Brassica oleracea (Saleh et al. 1976b) und in Pollen von Tulpen (Wiermann und Buth-Weber 1980) charakterisiert. Da das Enzym sowohl Anthocyanidine als auch Flavonole als Substrate akzeptiert, wurde es UDP-Glucose: Anthocyanidin / Flavonol-3-O-Glucosyltranferase genannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die 3-Glucosidierung in Matthiola incana und in Callistephus chinensis naeher charakterisiert und deren genetische Abhaengigkeit bestimmt.

3.1.1. 3-Glucosidierung in Matthiola incana

3.1.1.1. Pflanzenmaterial

Matthiola incana R.Br. ist ein seit langem intensiv untersuchtes Objekt, das zunaechst von Kappert und seinen Schuelern untersucht wurde (Kappert 1949). Seyffert bearbeitete das Material weiter, so dass am hiesigen Institut eine grosse Anzahl genetisch definierter Linien vorliegt. Die Linien sind bezueglich einiger Gene, die die Anthocyanbiosynthese betreffen, charakterisiert (Seyffert 1971), (Tab. 4).

Gen b kontrolliert die Aktivitaet der Flavonoid 3´ -Hydroxylase (Forkmann et al. 1980). Blueten mit dominanten Allelen produzieren Cyanidinderivate und solche mit rezessiven Allelen Pelargonidin.Das Gen e betrifft die enzymatische Reduktion der Dihydroflavonole zu den Flavan 3,4-Diolen (Heller et al. 1985a und 1985b). Gen f kontrolliert die Aktivitaet der Chalkonsynthase (Spribille und Forkmann 1981). In Anwesenheit von rezessiven Allelen (ff) reichern sich die Zimtsaeureglucoside an (Ritter-Thomas 1973). Die Gene g und z greifen ebenfalls in die Anthocyansynthese nach der Bildung der Dihydroflavonole ein (Seyffert 1962b). Ihre Rolle ist jedoch unklar. Insgesamt verhindern rezessive Allele der Gene e, f und g die Anthocyanbiosynthese (Kappert 1949, Forkmann 1977a). Bei Gen g liegt multiple Allelie vor. Das Allel g´ erlaubt wie das rezessive Allel von Gen z die Bildung von Anthocyanen in reduzierter Menge.

Tabelle 4: Genotyp, Phaenotyp und Hauptflavonoid von genetisch definierten Linien

Linie	Genotyp bb/ee/ff/zz/g g	Hauptflavonoid	Bluetenfarbe
08	++/++/++/++/+ +	Cy 3-Glycoside	braun violett
16	bb/++/++/++/+ +	Pg 3-Glycoside	braun karmin
17b	bb/ee/++/++/+ +	Km-Glycoside	weiss
$17b^+$	++/ee/++/++/+ +	Km-Glycoside	weiss
18b	bb/++/ff/++/+ +	Zimtsaeure-G	weiss
$18b^+$	++/++/ff/++/+ +	Zimtsaeure-G	weiss
$19b^+$	++/++/++/++/g g	Km-Glycoside	weiss
20	++/ee/ff/++/+ +	nicht untersucht	weiss
21	++/ee/++/++/g g	Km-Glycoside	weiss
22	++/++/ff/++/g g	nicht untersucht	weiss
26	bb/++/++/++/g´g´	Pg-Glycoside	blass karmin
24	++/++/++/++/g´g´	Cy-Glycoside	blass violett
27	bb/++/++/zz/+ +	Pg-Glycoside	blass karmin
25	++/++/++/zz/+ +	Cy-Glycoside	blass violett
28	++/++/++/zz/g´g´	nicht untersucht	weiss
29	bb/++/++/zz/g´g´	nicht untersucht	weiss

3.1.1.2. Enzymnachweis und Charakterisierung

Um die enzymatische Glucosidierung in 3-Position ohne Stoerungen durch andere Glycosidierungen untersuchen zu koennen, wurden die Mutanten 08 und 16 verwendet. Diese Linien produzieren hauptsaechlich Cy 3-G bzw. Pg 3-G und sind bezueglich der Gene, die andere Glycosidierungen der Anthocyane betreffen, rezessiv.

Nach Inkubation eines Enzymextraktes dieser Linien mit UDP-Glucose und Pg oder Cy, zeigte die HPLC-Analyse der Reaktionsmischung einen neuen Peak, dessen Retentionszeit kleiner ist als die des entsprechenden Anthocyanidins. Diese Produkte wurden durch DC in BAW und HOAc - HCl und HPLC als 3-Glucoside der eingesetzten Anthocyanidine identifiziert. Die R_f- und R_t-Werte sind in Tabelle 1 bzw. 2 zusammengefasst. Die Spektralanalyse und die zeitlich kontrollierte Hydrolyse bestaetigen diese Identifizierung.

Ein Vergleich bzgl. der Enzymaktivitaet zwischen dem Rohextrakt und dem G-50 Eluat zeigte keinerlei Unterschied. Der Rohextrakt enthielt noch Anthocyane, die die Quantifizierung des Reaktionsgemisches beeintraechtigten. Deshalb wurde der gereinigte Enzymextrakt, der keine Anthocyane enthielt, fuer weitere Untersuchungen verwendet. Der Proteingehalt des G-50-Eluats betrug 1 mg / ml.

Neben den Anthocyanidinen Cy und Pg wurden Dp und Pn als Substrate getestet. Auch diese wurden in gleichem Masse in ihre 3-Glucoside ueberfuehrt wie Cy und Pg, die in Matthiola incana als Anthocyandine vertreten sind. Ein Reaktionsansatz, in dem Pg, Cy und Dp gleichzeitig als Substrate eingesetzt wurden, zeigte, dass die 3 GT keines als Substrat bevorzugt, sondern alle drei mit der gleichen Umsatzrate in die 3-Glucoside ueberfuehrt (Abb. 6). Ausser den Anthocyandinen wurden noch Vertreter anderer Flavonoidklassen wie z.B: Nar, Eri, DHQ, Ap, Lu, Qu und Km als Substrate ueberprueft. Nur von den Flavonolen Qu und Km wurden die entsprechenden 3-Glucoside gebildet. Ihre Umsatzrate war sogar hoeher als die der Anthocyanidine. Zur eindeutigen Quantifizierung der Umsatzraten von Pg und Qu als Substrate, wurde ^{14}C-markierte UDP-

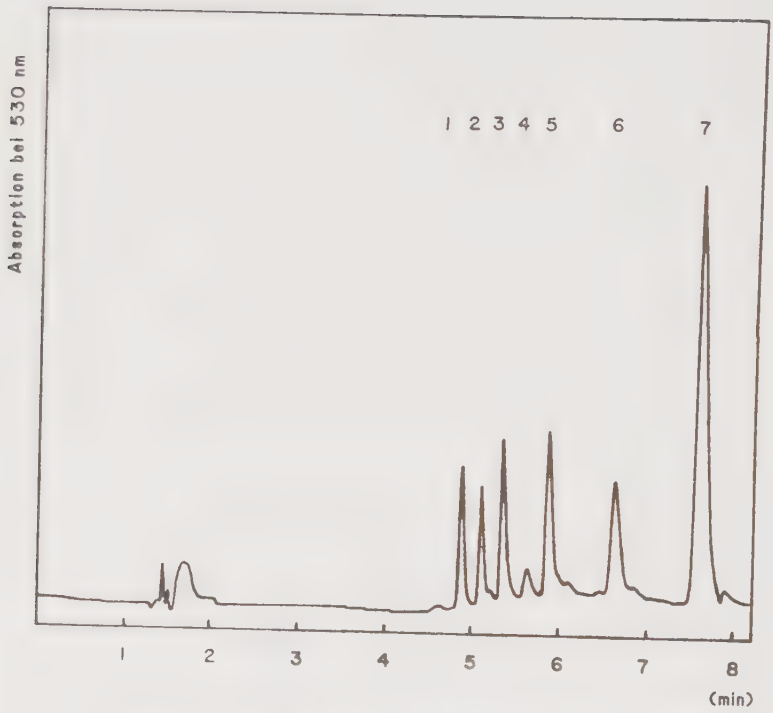


Abb. 6: HPLC-Analyse der 3-Glucosidierungreaktion von Pg, Cy und Dp

Glucose eingesetzt und die Reaktionsmischung durch DC aufgetrennt. Wie Messungen mit dem Szintillationszaehler ergaben, lieferten die Substrate Pg bzw. Qu unter gleichen Bedingungen 0.9 nmol Pg 3-G / µg Protein bzw. 2.4 nmol Qu 3-G / µg Protein. Wurden Pg und Qu im selben Reaktionsansatz als Substrate eingesetzt, so entstanden die entsprechenden 3-Glucoside mit der gleichen Umsatzrate wie in den Ansaetzen, bei denen nur eines der beiden als Substrat fungierte. Fuer die weitere Charakterisierung der 3-Glucosyltransferase wurden Qu und Pg als Substrate eingesetzt. Pg wurde als Anthocyanidin ausgewaehlt, da es unter den Reaktionsbedingungen das stabilste ist (Abb. 7). Die anderen Anthocyandine Cy und Dp zersetzen sich noch schneller, Qu wurde als Vertreter der Flavonole verwendet. Es ist unter den Reaktionsbedingungen stabil (Abb. 7).

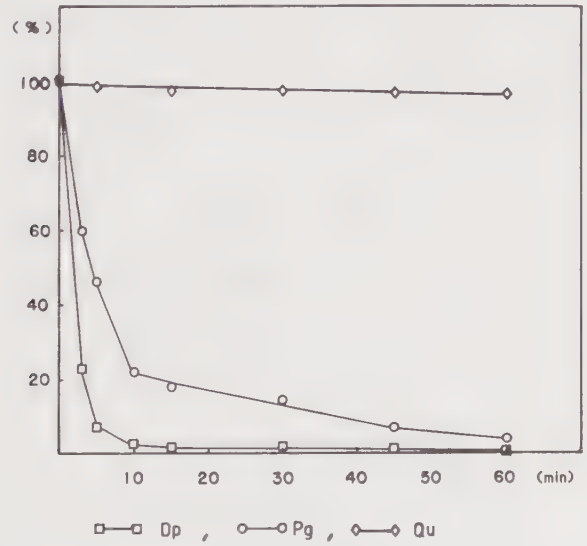


Abb. 7: Stabilitaet von Qu, Pg und Dp in 0.05 M Kpi (pH = 7.0)

Ferner wurde geprueft, ob neben UDP-Glucose auch andere aktivierte Glucosen wie ADP-, CDP-, GDP- und TDP-Glucose als Zuckerdonoren fungieren koennen. Nur von TDP-Glucose wurde die Glucose auf das Anthocyanidin bzw. Flavonol uebertragen. Die Reaktionrate betraegt 75% verglichen mit UDP-Glucose als Zuckerdonor (100%). Mit den uebrigen Verbindungen wurde kein Umsatz beobachtet. Andere Zuckerverbindungen wie UDP-Xylose, UDP-Mannose, UDP-Galaktose und UDP-Glucuronsaeure eigneteten sich nicht als Zuckerdonor. Die Glycosidierung in 3-Stellung ist auf Glucose beschraenkt.

Untersuchungen zur Protein- und Zeitlinearitaet zeigten, dass die Reaktion bis zu 0.03 mg Protein und bis zu einer Inkubationszeit von 5 min fuer Pg und 10 min fuer Qu linear verlaeuft. Die 3 GT ist ein hoch aktives Enzym. Innerhalb von 0.5 min setzt sie 10% des eingesetzten Substrates um.

Die Abhaengigkeit der Reaktionrate von den beiden Substraten wurde untersucht. Eine Saettigung des Enzyms mit UDP-Glucose wurde bei 70 nmol pro Ansatz erreicht.

Bei den Messungen in Abhaengigkeit von der Flavonoidkonzentration zeigte es sich, dass sowohl fuer Pg als auch Qu eine Substrathemmung vorliegt. Die beste Umsatzrate wurde fuer beide Substrate bei einer Konzentration von 10 nmol pro Ansatz erzielt (Abb. 8). Waehrend bei einer hoeheren Substratkonzentration fuer Qu der Umsatz steil abfaellt, bleibt sie fuer Pg zunaechst auf dem hohen Niveau bis zu einer Konzentration von 30 nmol und faellt erst dann steil ab.

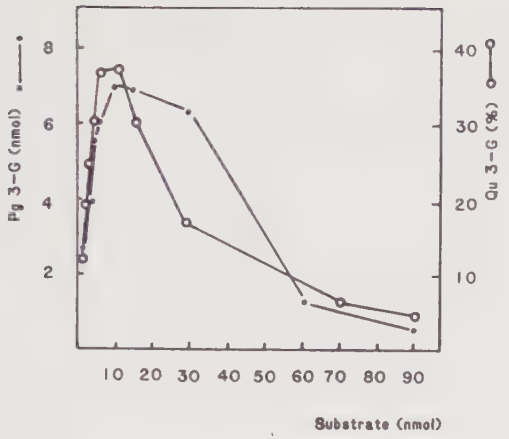


Abb. 8: 3-Glucosidbildung von Pg und Qu in Abhaengigkeit von der Substratkonzentration

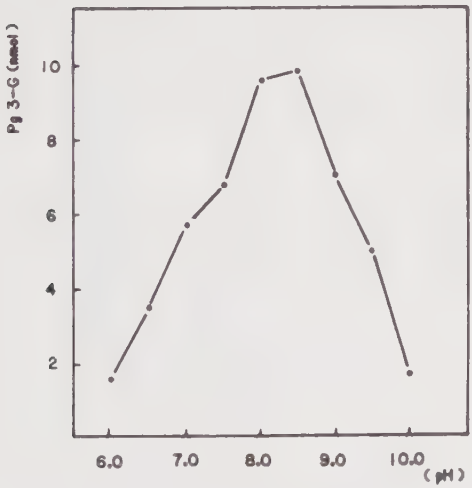


Abb. 9: pH-Abhaengigkeit der 3-Glucosidierung von Pg

Das pH-Optimum wurde in Britton-Robinson-Puffer (Rauen 1967) bestimmt (Abb. 9). Es liegt fuer die 3-Glucosidierung von Pg bei 8.5 und fuer Qu bei 9.5. Die unterschiedlichen pH-Optima fuer Pg und Qu sind dadurch erklaerbar, dass sich Pg unter basischen Bedingungen schneller zersetzt als unter neutralen,waehrend Qu selbst unter alkalischen Bedingungen noch weitgehend stabil ist. Aus diesem Grunde wurden die Messungen nicht im pH-Optimum, sondern bei pH = 7.0 durchgefuehrt. Bei pH = 7.0 zeigt Pg noch 60% und Qu noch 65% Umsatz verglichen mit dem jeweiligen Optimum. Ein Vergleich der Reaktionsraten in den verschiedenen Puffersystemen 0.1 M Kpi, 0.1 M NaOH / Glycin, 0.1 M Tris / HCl und Britton-Robinson bei gleichem pH ergab, dass der hoechste Umsatz in 0.1 M Kpi erreicht wird. In Tris / HCl ist die Rate auf 75%, in NaOH / Glycin und in Britton-Robinson auf 50% reduziert. Eine Verringerung der Kaliumphosphat-Konzentration von 0.1 M auf 0.05 M fuehrte nicht zu nennenswerten Aktivitaetsunterschieden des Enzyms. Weil die geringere Salzkonzentration die HPLC-Saeule schont, wurden die Standardtests mit 0.05 M Kpi-Puffer durchgefuehrt.

Fuer das Enzym wurde bei einer Reaktionszeit von 3 min ein Temperaturoptimum von 40°C gefunden. Bei 0°C betrug die Enzymaktivitaet noch 20% des Optimums. Der gleiche Wert wurde bei 60°C gemessen.

Um die Stabilitaet des Enzyms bei 30°, 40°, 50°, 60° und 70°C zu bestimmen, wurde der Enzymextrakt 0.5 - 60 min vorinkubiert und anschliessend die Reaktion, wie unter Kap. 2.3.6. beschrieben, durchgefuehrt. Aus Abb. 10 ist ersichtlich, dass das Enzym bei 30°C und 40°C bis wenigstens 60 min stabil ist. Die anfaengliche Steigerung bei 40°C faellt spaeter auf das eigentliche Aktivitaetsniveau zurueck. Bei hoeheren Temperaturen wird das Enzym zerstoert. Je hoeher die Temperatur, desto schneller erfolgt die Denaturierung. Diese Stabilitaetaetsmessungen waren identisch fuer Pg und Qu als Substrate.

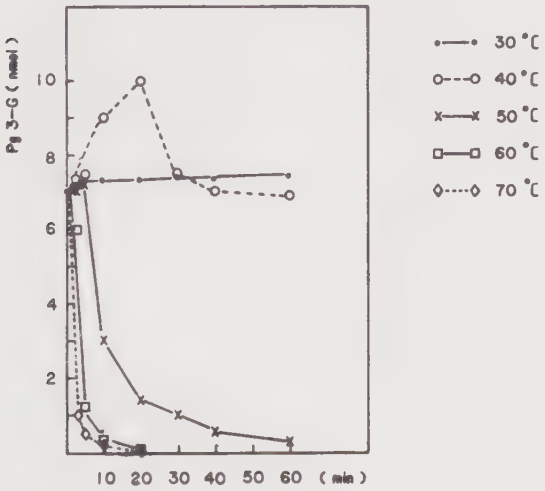


Abb. 10: Stabilitaet der 3 GT bei verschiedenen Temperaturen

Der Rohextrakt und das Sephadex G-50-Eluat konnten bei -20°C ohne BSA- und Glycerin-Zusatz monatelang ohne Aktivitaetsverlust der 3 GT aufbewahrt werden.

Der Einfluss von Ionen und gaengigen Inhibitoren auf die 3 GT wurde untersucht (Tab. 5). Einwertige Ionen wie Kalium beeinflussten die Reaktion nicht, waehrend zweiwertige Ionen unterschiedliche Resultate brachten. Die Ionen der Erdalkalimetalle Ca und Mg stimulierten leicht, und die Ionen der Uebergangsmetalle inhibierten. Komplexierende Agenzien wie KCN und EDTA wirkten sich nur geringfuegig auf die Reaktion aus. P-CMB und DPC reduzierten die Reaktion deutlich. Der Einfluss dieser Substanzen auf die 3-Glucosidierung von Pg und Qu ist aehnlich.

Tabelle 5: Effekt von Metallionen und Inhibitoren auf die 3-Glucosidierung von Pelargonidin und Quercetin

Zusatz	3-Glucosyltransferase-Aktivitaet (%)[a]	
	Pelargonidin	Quercetin
kein	100	100
1 mM KCl	100	100
1 mM K_2SO_4	100	100
1 mM KCN	100	100
1 mM $CaCl_2$	105	110
1 mM $MgCl_2$	110	110
1 mM $CoCl_2$	111	110
1 mM $FeCl_2$	37	40
1 mM $FeSO_4$	48	50
1 mM $CuSO_4$	23	15
1 mM $ZnSO_4$	87	73
1 mM $ZnCl_2$	79	80
2 mM EDTA	93	95
2 mM DDC	115	105
1 mM DPC	60	45
0.2 mM p-CMB	70	-

[a] Die Angaben sind Mittelwerte.

3.1.1.3. Genetische Kontrolle

Die Untersuchungen zur genetischen Kontrolle wurden sowohl mit Pg als auch mit Qu durchgefuehrt. 3 GT-Aktivitaet war nicht nur in den anthocyanhaltigen Linien vorhanden, sondern auch in solchen

deren Anthocyanbiosynthese blockiert ist. Um den Einfluss der Gene e, f, g und z auf die 3 GT-Aktivitaet zu pruefen, wurden Mutanten mit verschiedenen Allelkombinationen dieser Gene untersucht (Tab. 6). Zunaechst wurde bei farbigen Linien wie 16 und 08 kein Unterschied fuer die Glucosidierung von Cy bzw. Pg und Qu gefunden. Beide Linien zeigten mit den genannten Substraten die gleiche 3 GT-Aktivitaet. Eine leichte Reduzierung der Aktivitaet wurde bei der Linie 18, die rezessive Allele fuer Gen f besitzt, festgestellt. Hingegen zeigten Linien, die homozygot rezessiv fuer Gen e (Linie 17) oder homozygot rezessiv fuer Gen z sind, eine auffallende Reduktion der Enzymaktivitaet. Bei der multiplen Allelie am Locus g wurde in Abhaengigkeit vom jeweiligen Allel verschieden stark reduzierte 3 GT-Aktivitaet gefunden. In Linien mit dem Allelen g´g´ war die 3 GT-Aktivitaet auf 20% reduziert, waehrend bei rezessiven Allelen (gg) eine Reduktion auf 5 - 10% gemessen wurde (Linie 19, 21, 22). Doppelmutanten zeigten je nach Allelkombination unterschiedliche Effekte. Bei den Kombinationen eeff (Linie 20), eegg (Linie 21) und ffgg (Linie 22) konnten keine additiven Effekte gegenueber den Einzelmutanten festgestellt werden. Lediglich in Linie 28 (zzg´g´) war eine zusaetzliche Verringerung gegenueber den Einzelmutanten feststellbar. Die genauen Aktivitaetsangaben sind in Tab. 6 zu finden.

Tabelle 6: 3 GT-Aktivitaet in den verschiedenen Linien

Linie	3 GT-Aktivitaet (%)[a]	
	Pelargonidin	Quercetin
08	100	100
16	100	100
17b	27	40
17b^{+}	25	22
18b	84	92
18b^{+}	77	91
19b^{+}	7	10
20	36	39
21	10	15
22	5	6
24	19	21
26	17	24
25	35	35
27	22	29
28	8	13
29	8	14

[a] mit jeweils 0.02 mg Protein

Die Angaben sind Mittelwerte.

3.1.2. 3-Glucosidierung in Callistephus chinensis

3.1.2.1. Pflanzenmaterial

Aufgrund langjaehriger Kreuzungsexperimente an unserem Institut standen 17 verschiedene definierte Genotypen von Callistephus chinensis zur Verfuegung. Nur einige dieser Genotypen wurden in die Untersuchungen zur 3 GT-Aktivitaet einbezogen (Tab. 7).

Tabelle 7: Geno- und Phaenotypen der Linien von Callistephus chinensis

Linie	Phaenotyp	Genotyp AA/FF/ChCh/RR/MM/GG/EE
03	rosa	AA/FF/ChCh/rr/MM/GG/EE
06	rot	AA/FF/ChCh/rr/mm/GG/EE
07	hell gelb	aa/FF/chch/rr/MM/GG/EE
08	hell elfenbein	aa/Ff/ChCh/rr/MM/gg/ee
09	weiss	aa/FF/ChCh/RR/MM/GG/EE
10a, 10b	dunkel elfenbein	AA/ff/ChCh/RR/MM/GG/ee
10c, 10f	hell elfenbein	aa/FF/ChCh/RR/MM/gg/ee
10d	hell elfenbein	aa/FF/ChCh/RR/MM/gg/ee
10e	dunkel gelb	AA/ff/chch/rr/MM/GG/ee
10h	dunkel gelb	AA/ff/chch/rr/MM/GG/EE
10g	creme	AA/ff/ChCh/rr/MM/GG/EE

Die Linien unterscheiden sich in den Allelkombinationen von Genen, die die Anthocyanbiosynthese selbst oder Anthocyanmodifikationen kontrollieren. Das Allelenpaar M / m betrifft die Gluco-

sidierung der Anthocyane in 5-Position (Wit 1937, Forkmann 1977b, Teusch 1984). Am r-Locus, der die Hydroxylierung des B-Ringes kontrolliert, liegt multiple Allelie vor. Unter dem Einfluss des Allels R wird neben viel Dp auch Cy gebildet. Bei Blueten des Typs r´r´ ueberwiegt Cy neben Pg und Dp, waehrend Blueten des Typs rr nur Cy und Pg enthalten (Forkmann 1977b, Teusch 1984). Das Genpaar Ch / ch ist fuer die Aktivitaet der Chalkon-Isomerase verantwortlich (Kuhn et al. 1978). Zur Anthocyansynthese sind Wildtypallele an den Loci a, f und g erforderlich (Loewer 1976, Seyffert 1982). Fruehere PC-Untersuchungen (Seyffert, persoenliche Mitteilungen) und Supplementationsexperimente (Forkmann, persoenliche Mitteilungen) erlauben die Vermutung, dass diese Loci Biosyntheseschritte zwischen den Dihydroflavonolen und Anthocyanidinen kontollieren. Das Gen f betrifft die Dihydroflavonol 4-Reduktase (Ruhnau 1986). Da die 3 GT fuer die Stabilisierung der gebildeten Anthocyanidine verantwortlich ist, besteht die Moeglichkeit, dass die Blockierung der Anthocyanbiosynthese dadurch erklaert werden kann, dass der Ausfall dieses Enzyms eine Stabilisierung der gebildeten Anthocyanidine verhindert und diese zerfallen. Eines der Gene a, f und g koennte die 3 GT-Aktivitaet beeinflussen.

3.1.2.2. Nachweis des Enzyms

Die bei Matthiola incana angewandten Enzympraeparationen und optimierten Testbedingungen konnten fuer Callistephus chinensis uebernommen werden. Der Proteingehalt des G-50-Eluats war allerdings geringer. Er betrug 0.2 mg Protein / ml und somit war die Proteinmenge im Test ebenfalls geringer (vgl. Kap. 2.3.2).

Eine Inkubation des Enzymextraktes der Linie 06 mit UDP-Glucose und Anthocyandin bzw. Flavonol fuehrte zur Bildung der entsprechenden 3-Glucoside. Die Identifizierung erfolgte in gleicher Weise wie bei Matthiola incana. Es wurden aehnlich gute Umsaetze erzielt wie bei Matthiola incana. Allerdings war die Umsatzrate fuer die Anthocyandine und Flavonole gleich. Die 3 GT aus Callistephus chinensis zeigte eine aehnliche Stabilitaet wie die aus Matthiola incana. Der Enzymextrakt konnte ebenfalls ohne Aktivitaetsverlust bei -20°C mehrere Monate aufbewahrt werden. Auch bei 0° C katalysiert diese Transferase die 3-Glucosidierung. Jedoch ist der Umsatz auf 30% gegenueber dem bei 30°C gesunken und bei 70°C betraegt er nur mehr 20% des Maximalwertes. Ferner wurde die Reaktion ebenfalls gehemmt, wenn die Substratmenge verglichen mit dem "Optimalwert" verdoppelt wurde. Nur TDP-Glucose wurde neben UDP-Glucose als Zucker-Donor akzeptiert. Alle anders aktivierten Glucosen wurden nicht uebertragen. Mit TDP-Glucose betrug der Umsatz 70% des Wertes der mit UDP-Glucose erreicht wurde.

Um den direkten Vergleich mit der 3 GT aus Matthiola incana zu gewaehrleisten, wurde auch bei der 3 GT aus Callistephus chinensis bei einem pH-Wert von 7.0 gearbeitet. Eine Messung des pH-Optimums wurde nicht durchgefuehrt, da der pH-Wert der Standardtests durch die Stabilitaet der Substrate bestimmt wurde und nicht durch das pH-Optimum der Reaktion selbst.

Aktivitaetsmessungen der 3 GT im Verlauf der Bluetenentwicklung konnten nicht durchgefuehrt werden, da eine Einteilung in mehrere Stadien bei der Sommeraster nicht moeglich ist.

3.1.2.3. Genetische Kontrolle

Pg wurde als Substrat bei den Untersuchungen zur genetischen Kontrolle eingesetzt. Bei den untersuchten Linien mit Wildtypallelen (03 und 06) wurde gleiche 3 GT-Aktivitaet gefunden. In allen untersuchten Mutanten wurde ausser in Linie 10g eine veraenderte 3 GT-Aktivitaet festgestellt (Tab. 8). Die Linie 10a zeigte gesteigerte 3 GT-Aktivitaet (140%) gegenueber den anthocyanbildenden Linien (100%). Eine reduzierte Enzymaktivitaet konnte bei den genetisch identischen Linien 10d (57%) und 10f (67%) festgestellt werden. Die Linien 10e und 10h unterscheiden sich in ihrer 3 GT-Aktivitaet betraechtlich (18% bzw. 53%). Diese Differenz ist moeglicherweise auf die verschiedenen Allele am Locus E zurueckzufuehren. Auch in den Genotypen 07, 08 und 09 liegt reduzierte 3-GT-Aktivitaet vor. Jedoch kann aus diesen Ergebnissen kein Gen fuer die Kontrolle der 3 GT verantwortlich gemacht werden. Vielmehr ist zu folgern, dass bei gleicher Kombination bekannter Gene ein unterschiedlicher genetischer Hintergrund vorliegt.

Tabelle 8: 3 GT-Aktivitaet in den Linien von Callistephus chinensis

Linie	3 GT-Aktivitaet (%)[a]
03	100
06	100
07	85
08	75
09	58
10a	140
10d	57
10e	18
10f	67
10g	100
10h	53

[a] mit jeweils gleicher Proteinmenge.

Daten sind jeweils Mittelwerte.

3.2. 5-Glucosidierung

Die durch die 3 GT gebildeten 3-Glucoside sind Substrate fuer weitere Modifizierungen der Anthocyane. Eine dieser Modifikationen ist die Glucosidierung in 5-Stellung. Diese Reaktion ueberfuehrt die 3-Glucoside (Matthiola incana und Callistephus chinensis) oder 3-Sambubioside (Matthiola) in die entsprechenden in 5-Stellung glucosidierten Verbindungen, welche schon in vielen Pflanzen gefunden wurden (Harborne 1967, Timberlake und Bridle 1975, Hrazdina 1982). Dagegen wurden Anthocyane, die nur in 5-Position glucosidiert sind, bisher in der Natur nicht entdeckt.

3.2.1. 5-Glucosidierung in Matthiola incana

In Matthiola incana sind Anthocyanidin 3.5-diglucoside und - 3-Sambubiosid-5-Glucoside vorhanden. Dies und erste Ergebnisse enzymatischer Untersuchungen fuehrten zu der Vermutung, dass in Matthiola incana ein Enzym vorhanden ist, das die Glucosidierung in 5-Stellung katalysiert (Seyffert 1982).Aufgrund der wesentlich hoeheren Konzentration von Anthocyanidin 3.5-T verglichen mit -3.5-D wurde gefolgert, dass die 3-Sambubioside bessere Substrate fuer die Reaktion sind als die 3-Glucoside. Chemogenetische Untersuchungen zeigten, dass die in 5-Stellung glucosidierten Anthocyane nur dann gefunden werden, wenn Wildtypallele von Gen 1 vorliegen (Seyffert 1960, 1962a, 1982). Demnach sollte Gen 1 diese Glucosidierung kontrollieren.

3.2.1.1. Pflanzenmaterial

Die Untersuchungen wurden an Matthiola incana Linie 01 - 08 durchgefuehrt (Tab. 9).

Tabelle 9: Geno- und Phaenotyp, Hauptanthocyankomponente der Linien von Matthiola incana

Linie	Genotyp bb/ll/uu/vv	Phaenotyp	Hauptanthocyan
01	++/++/++/++	leucht. violett	Cy 3.5-T acyl.
02	++/ll/++/++	stumpf violett	Cy 3-B acyl.
03	++/++/uu/++	braun violett	Cy 3-G, wenig Cy 3.5-T
04	++/++/++/vv	leucht. lila	Cy 3.5-T, Cy 3.5-T und Cy 3.5-D acyl.
05	++/ll/uu/++	stumpf braun violett	Cy 3-G wenig Cy 3-B
06	++/ll/++/vv	stumpf lila	wenig Cy 3-G Cy 3-G acyl. Cy 3-B Cy 3-B acyl.
07	++/++/uu/vv	braun lila	Cy 3-G wenig Cy 3.5-T und Cy 3.5-D
08	++/ll/uu/vv	braun violett	Cy 3-G, Cy 3-B

Gen b kontrolliert die Aktivitaet der 3'-Hydroxylase (Forkmann et al. 1980). Fuer die Gene u und v wird vermutet, dass sie die Biosidbildung und die Acylierung betreffen (Seyffert 1960). In Genotypen mit rezessiven Allelen der Gene u und v sind keine acylierten Anthocyane und nur geringe Mengen an 3-Sambubiosiden vorhanden. Gen l beeinflusst die 5-Glucosidbildung (Seyffert 1960, 1982). Alle Linien besitzen bezueglich der Gene e, f, g und z dominante Allele.

3.2.1.2. Nachweis und Charakterisierung des Enzyms

Die Praeparation des Rohextraktes erfolgte vornehmlich aus der Linie 07, da hier das Gen l als einziges Gen, welches Glycosidierungs-bzw. Acylierungsreaktionen kontrolliert, mit dominanten Allelen vorliegt und so stoerende Nebenreaktionen, die der Kontrolle der Gene u und v unterliegen, ausgeschaltet sind.

Inkubationen des Enzymextraktes von Linie 07 mit UDP-Glucose und Cy 3-B fuehrten zur Bildung eines einzigen Produktes. Das Produkt zeigte eine hoehere Polaritaet als Cy 3-B und besass somit bei der HPLC-Analyse eine kleinere Retentionszeit. Durch Chromatographie des Reaktionsgemischs und der betreffenden Fraktion der HPLC-Trennung in 3 verschiedenen Laufmitteln (BAW, HOAc - HCl, Bu - HCl) wurde das Produkt als Cy 3.5-T identifiziert. Eine weitere Bestaetigung, dass es sich um Cy 3.5-T handelt, lieferte die kontrollierte saure Hydrolyse. Durch den Abbau mit HCl entstanden aus dem Reaktionsprodukt (Cy 3.5-T) zunaechst Cy 3.5-D, dann Cy 3-G sowie das relativ stabile Cy 5-G und zuletzt das Aglykon Cy.

Da auch hier die im Rohextrakt enthaltenen Anthocyane die

Quantifizierung des Reaktionsgemischs durch HPLC erschwerten, wurde fuer die weiteren Untersuchungen der ueber Sephadex G-50 gereinigte Extrakt als Enzymquelle verwendet. Das G-50-Eluat enthielt 1 mg Protein / ml Loesung.

Der gereinigte Extrakt konnte einige Tage bei -20°C aufbewahrt werden. Nach einer Woche Lagerung wurde schon ein betraechtlicher Aktivitaetsverlust gefunden, der nach zwei Wochen auf 50 % des frischen Extraktes zurueckging. Ein totaler Verlust der Enzymaktivitaet wurde erst nach vier Wochen festgestellt. Das steht im Gegensatz zur enormen Stabilitaet der 3 GT, wo selbst nach Monaten kein Aktivitaetsrueckgang zu verzeichnen war. Messungen zur Temperaturabhaengigkeit der 5 GT-Reaktion zeigten, dass sie ein Optimum von 40°C besitzt (Abb. 11). Selbst bei 0°C ist Enzymaktivitaet zu beobachten, die ca. 15% des Optimums betraegt. Die gleiche Aktivitaet wird bei 65°C gemessen. Aus Abb.11 ist ersichtlich, dass die 5 GT ab 40°C sehr schnell denaturiert wird, da der Aktivitaetsabfall sehr steil ist. Der Anstieg von 0°C auf 40° C verlaeuft wesentlich flacher.

Im Standardtest verlief die Enzymreaktion bis zu einer Proteinmenge von 0.03 mg linear. Eine lineare Abhaengigkeit zwischen Reaktionszeit und Produktbildung bestand bis 15 min Reaktionsdauer.

Ein optimaler Umsatz von Cy 3-B in Cy 3.5 -T war in 0.1 M Kpi-Puffer bei pH = 7.5 zu erreichen (Abb. 12).

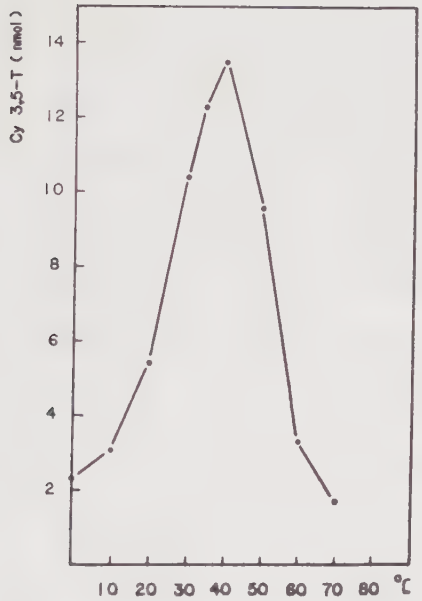


Abb. 11: Temperaturabhaengigkeit der 5-Glucosidierung von Cy 3-B

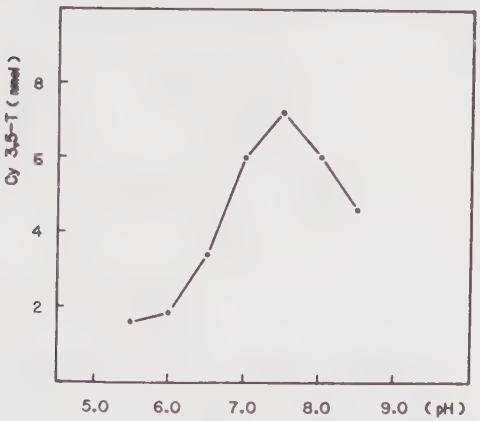


Abb. 12: pH-Abhaengigkeit der 5-Glucosidierung von Cy 3-B

Die 5 GT-Reaktion war erst bei hohen Konzentrationen an UDP-Glucose (ab 700 nmol) gesaettigt. Eine Saettigung mit Cy 3-B erfolgte schon bei 40 nmol. Jedoch wurde die Reaktion ab 60 nmol Cy 3-B stark gehemmt, so dass eine Konzentration von 50 nmol Cy 3-B als Optimalwert anzusehen ist und Standardmessungen mit dieser Substratkonzentration durchgefuehrt wurden.

Unter Standardbedingungen wurden mit UDP-Glucose und Cy 3-B 20 nmol Cy 3.5-T gebildet. Die gleiche Menge an Produkt wurde mit Pg 3-B als Substrat gefunden. Die 3-Glucoside von Pg und Dp hingegen sind schlechte Substrate. Mit ihnen betrug die Umsatzrate nur 10% verglichen mit der der 3-Sambubioside. Da in Matthiola incana mit p-Cumarsaeure acylierte 3-Glucoside und 3-Sambubioside vorkommen, wurden auch diese als Substrat getestet. Sie waren wesentlich bessere Substrate als die entsprechenden Basisverbindungen. Ein 10-fach besserer Umsatz als bei den 3-Glucosiden wurde mit dem acylierten 3-Glucosid erreicht, und die recht hohe Reaktionsrate des 3-Sambubiosids wurde bei Verwendung der acylierten Verbindung noch um 50% gesteigert. Auch hier erfolgte die eingangs erwaehnte Identifikation durch HPLC, DC und kontrollierte Hydrolyse. Wie erwartet, wurden weder die Anthocyanidine Pg, Cy, Dp noch die Flavonole Qu, Km direkt in 5-Stellung glucosidiert. Es wurden nur 3-Glucoside gebildet. Andere Flavonoide wie Qu 3-G, Ap 7-G, Ap, Nar, Nar 7-G, Eri 7-G und DHQ wurden nicht in 5-Stellung glucosidiert.

Statt des Glucose-Donors UDP-Glucose wurden noch andere aktivierten Glucose-Molekuele wie ADP-, CDP-, GDP- und TDP-Glucose geprueft. Nur mit TDP-Glucose wurde eine 5-Glucosidierung beobach-

tet, deren Umsatz 42% des Umsatzes mit UDP-Glucose betrug. Andere Zucker wie UDP-Xylose, -Mannose, -Galaktose und -Glucuronsaeure wurden nicht als Zucker-Donoren akzeptiert. Dies zeigt, dass die Glycosidierung der 5-Stellung in Matthiola incana tatsaechlich auf die Glucose beschraenkt ist. Das Enzym wird deshalb als UDP-Glucose: Anthocyan-5-O-Glucosyltransferase bezeichnet.

Um den Einfluss von Ionen und Inhibitoren auf die Enzymaktivitaet zu pruefen, wurden diese in 0.01 ml Loesung zugefuegt. Die Zugabe der divalenten Ionen von Ca, Mg und Mn zeigte keinerlei Effekt auf die Reaktion, waehrend die zweiwertigen Ionen der Metalle Zn, Fe und Co eine starke Hemmung verursachten und letztlich Cu^{2+} die Reaktion total blockierte (Tab. 10). Von den getesteten Inhibitoren reduzierten EDTA, DPC und p-CMB die Enzymaktivitaet (Tab. 10). Auffallend war, dass keine 5-Glucosidierung stattfand, wenn die 3-Sambubioside in EGME geloest wurden. Bei der 3-Glucosidierung hatte das Loesungsmittel keinen Effekt gezeigt.

Tabelle 10: Einfluss von divalenten Ionen und Inhibitoren auf die 5 GT-Aktivitaet

Zusatz	5 GT-Aktivitaet (%)[a]
kein	100
1 mM $MgCl_2$	100
1 mM $CaCl_2$	100
1 mM $MnCl_2$	90
1 mM $CoCl_2$	68
1 mM $ZnCl_2$	50
1 mM $ZnSO_4$	40
1 mM $CuSO_4$	0
1 mM $FeSO_4$	59
1 mM KCN	100
2 mM EDTA	68
2 mM DDC	100
2 mM DPC	80
0.2 mM p-CMB	56

[a] Daten sind Mittelwerte.

3.2.1.3. Verlauf der Enzymaktivitaet waehrend der Bluetenentwicklung

Der Aktivitaetsverlauf der 5 GT wurde ueber die acht Bluetenstadien, die von der noch ungefaerbten, kleinen Knospe bis hin zur welkenden Bluete fuehrt, untersucht (Abb. 13). Morphologische Kriterien wurden zur Unterscheidung der acht Bluetenstadien benutzt (Dangelmayr et al. 1983). In Stadium 1 ist nur geringe

Aktivitaet zu finden (30% des Maximums). Von Stadium 1 an steigt die Aktivitaet der 5 GT schnell und erreicht in Stadium 4 ihr Maximum. Von dort faellt sie wieder ab und zeigt in Stadium 8 die gleiche Aktivitaet wie in Stadium 1. Die Konzentration an 5-glucosidierten Anthocyanen in den entsprechenden Stadien wurde ebenfalls bestimmt. Parallel zum Verlauf der 5 GT-Aktivitaet steigt ihre Konzentration kontinuierlich bis zum Stadium 5 an, wo sie ihr Maximum erreicht. Allerdings faellt die Kurve nicht ab, sondern bleibt auf dem hohen Niveau. Das bedeutet, dass die 5-glucosidierten Verbindungen nicht mehr metabolisiert werden.

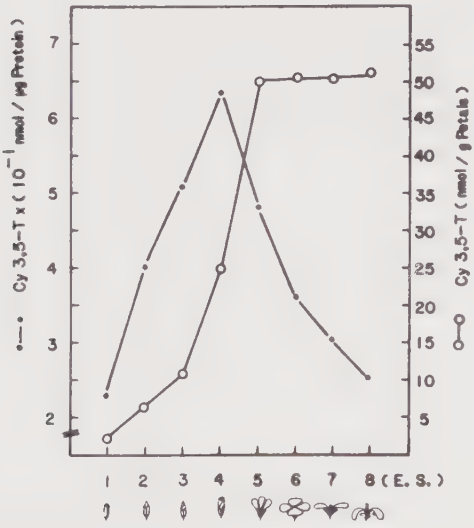


Abb. 13: Verlauf der Enzymaktivitaet in Abhaengigkeit von den Bluetenstadien und Akkumulation von Cy 3.5-T in den entsprechenden Stadien.

3.2.1.4. Genetische Kontrolle

Der Nachweis der 5 GT-Aktivitaet wurde nicht nur in Bluetenextrakten der Linie 07 erfolgreich gefuehrt, sondern auch in den Linien 01, 03 und 04 mit Wildtypallelen des Gens l wurde diese Aktivitaet nachgewiesen (Tab. 11). In Enzymextrakten des Genotys 08, der rezessive Allele an den Loci l, u und v aufweist, konnte keine 5 GT-Aktivitaet gefunden werden. Das gleiche Ergebnis wurde fuer die Linien 02, 05 und 06 erhalten. Diese Mutanten besitzen rezessive Allele des Gens l in Kombination mit Wildtypallelen der Gene u und v.

Tabelle 11: 5 GT-Aktivitaet in den Linien 01 - 08

Linie	Genotyp (ll/uu/vv)	5 GT-Aktivitaet (%)[a]
01	++/++/++	75
02	ll/++/++	0
03	++/uu/++	108
04	++/++/vv	80
05	ll/uu/++	0
06	ll/++/vv	0
07	++/uu/vv	100
08	ll/uu/vv	0

[a] gleiche Proteinmenge.

Daten sind Mittelwerte.

Zusaetzlich wurden noch Mischexperimente durchgefuehrt, die Anteile aus Enzymextrakten des Genotyps mit Wildtypallelen und des Genotyps mit rezessiven Allelen enthielten. Die Enzymaktivitaeten verhielten sich additiv. Das weist darauf hin, dass in rezessiven Genotypen kein loeslicher Inhibitor die 5 GT-Reaktion blockiert.

3.2.2. 5-Glucosidierung in Callistephus chinenesis

3.2.2.1. Pflanzenmaterial

Aus der Vielzahl der an unserem Institut vorliegenden definierten Linien wurden die anthocyanbildenden Linien 01 - 06 und die Linien 09 und 10a ausgewaehlt (Tab. 12). Die einzelnen Gene sind in Kap.3.1.2.1 genauer beschrieben. Im Zusammenhang mit der 5-Glucosidierung erscheint das Allelenpaar M / m besonders wichtig. In methanolischen Bluetenextrakten wurden nur dann 3.5-Diglucoside gefunden, wenn dominante Allele des Gen M vorliegen. Bei rezessiven Allelen sind nur 3-Glucoside zu finden (Forkmann 1977b, Teusch 1984).

Tabelle 12: Geno- und Phaenotypen der Linien von Callistephus chinensis

Linie	Genotyp AA/FF/ChCh/R R /MM	Phaenotyp	Glucosidierungsmuster der Anth.
01	AA/FF/ChCh/R R /MM	blau	3.5-D, 3-G
02	AA/FF/ChCh/r´r´/MM	lila	3.5-D, 3-G
03	AA/FF/ChCh/r r /MM	rosa	3.5-D, 3-G
04	AA/FF/ChCh/R R /mm	violett	3-G
05	AA/FF/ChCh/r´r´/mm	purpur	3-G
06	AA/FF/ChCh/r r /mm	rot	3-G
09	AA/FF/ChCh/R R /MM	weiss	keine Anth.
10a	AA/FF/ChCh/R R /MM	dunkel elfenbein	keine Anth.

3.2.2.2. Nachweis des Enzyms

Die Enzympraeparation konnte von Matthiola incana uebernommen werden. Als Enzymquelle dienten zunaechst Petalen der Linie 03. Der Rohextrakt enthielt wie bei Matthiola incana noch Anthocyane und eine Reinigung durch die Sephadex G-50-Saeule war erforderlich, um eine einwandfreie Quantifizierung zu gewaehrleisten. Das 50-Eluat enthielt 0.2 mg Protein / ml Loesung.

Auch dieser Enzymextrakt konnte einige Tage ohne 5 GT-Aktivitaetsverlust bei -20°C aufbewahrt werden. Nach zwei Wochen waren nur mehr 20% der urspruenglichen Aktivitaet vorhanden, und nach vier Wochen wurde ein totaler Verlust festgestellt.

Die fuer Matthiola incana optimierten Testbedingungen konnten benutzt werden. Lediglich das Substrat wurde veraendert. Es wurde Cy 3-G im Standardtest eingesetzt. Unter Standardbedingungen wurden mit 0.03 mg Protein 20 nmol Cy 3.5-D gebildet. Auch Cy 3-B als Substrat wurde in geringen Mengen in Cy 3.5-T umgesetzt (< 5 nmol). Die 3-Glucoside von Pg und Dp wurden mit gleicher Reaktionsrate zu den 3.5-Diglucosiden umgesetzt wie Cy 3-G. Die Anthocyanidine Pg, Cy, Dp und Pn sind keine Substrate fuer die 5 GT. Sie wurden wie erwartet nicht direkt in 5-Stellung glucosidiert. Auch TDP-Glucose diente dieser 5 GT als Glucose-Donor. Die Umsatzrate betrug 40% des Umsatzes mit UDP-Glucose. Mit anderen aktivierten Zuckermolekuelen wurde keine Reaktion beobachtet.

3.2.2.3. Genetische Kontrolle

Die 5 GT-Aktivitaet konnte nicht nur im Enzymextrakt von anthocyanhaltigen Blueten des Genotyps MM, sondern auch in Genotypen, deren Anthocyanbiosynthese blockiert ist, die jedoch Wildtypallele von Gen M besitzen, nachgewiesen werden. Hingegen war in Linien mit rezessiven Allelen am Locus M keine 5 GT-Aktivitaet nachweisbar (Tab. 13). In Mischinkubationen, bei denen G-50-Eluate sowohl aus einem Genotyp mit dominanten Allelen als auch aus einem Genotyp mit rezessiven Allelen eingesetzt wurden, verhielten sich die Enzymaktivitaeten additiv. Das bedeutet, dass in Genotypen mit rezessiven Allelen offenbar keine loesliche Inhibitoren der 5 GT vorliegen.

Tabelle 13: 5 GT-Aktivitaet in den Linien 01 - 06, 09 und 10a

Linie	5 GT-Aktivitaet (%)[a]
01	100
02	140
03	100
04	0
05	0
06	0
09	105
10a	100

[a] gleiche Proteinmenge

Angaben sind Mittelwerte.

3.3. Xylosylierung in Matthiola incana

Die Xylosylierung stellt wie die Glucosidierung eine weitere Modifizierung der Anthocyanidin 3-Glucoside dar. Bei dieser Reaktion wird an die Glucose in 3-Stellung eine Xylose angehaengt. Eine aehnliche Reaktion, bei der jedoch statt Xylose L-Rhamnose an das 3-Glucosid geheftet wird, wurde erstmals von Kamsteeg bei Silene dioica beschrieben (Kamsteeg et al. 1980b). Diese Reaktion steht unter der Kontrolle von Gen N.
Aus chemogenetischen Untersuchungen an Matthiola incana (Seyffert 1960) wurde geschlossen, dass die Xylose-Anheftung an die 3-Glucoside stattfindet. Um einen tieferen Einblick in die Xylosylierung selbst und deren genetische Kontrolle zu erhalten, sollte diese Reaktion naeher charakterisiert und deren genetische Kontrolle geklaert werden.

3.3.1. Pflanzenmaterial

Die Untersuchungen wurden an den bereits beschriebenen Genotypen 01 - 08 durchgefuehrt, in denen die Gene l, u und v variert werden (s. Kap.3.2.1.). Lediglich auf Gen u wird naeher eingegangen. Fruehere chemogenetische Studien zeigten, dass nur dann 3-Sambubioside in grossen Mengen vertreten sind, wenn sie acyliert sind und Wildtypallele des Gens u vorliegen, waehrend in Genotypen mit rezessiven Allelen nur geringe Mengen an unacylierten 3-Sambubiosiden gefunden werden (Seyffert 1960). Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass Gen u gleichzeitig eine Rolle bei der Xylosylierung und Acylierung spielt.

3.3.2. Nachweis und Charakterisierung des Enzyms

Erste Untersuchungen zur enzymatischen Xylosylierung wurden mit Enzymextrakten der Linie 06 durchgefuehrt. Dieser Genotyp bot sich fuer die Untersuchungen an, da die Gene l und v, die Modifizierungsreaktionen an den Anthocyanen betreffen, mit rezessiven Allelen vorliegen. Auf diese Weise wurden Stoerungen durch Reaktionen, die durch diese Gene l und v kontrolliert werden, eliminiert.

Nach Inkubation des Rohextraktes von Linie 06 mit Cy 3-G und UDP-Xylose zeigte die HPLC-Analyse einen neuen Peak. Dieser Peak wies mit der Retentionszeit von 3.6 min einen kleineren R_t-Wert auf als das Substrat Cy 3-G (R_t = 3.9 min). Der R_t-Wert des neuen Peaks war identisch mit der von Cy 3-B, welches aus methanolischen Extrakten isoliert worden war. Die HPLC-Trennung wurde fraktioniert und die Fraktion mit dem passenden R_t -Wert wurde durch DC in 15% HOAc und HOAc - HCl mit authentischem Cy 3-B als Cy 3-B identifiziert. Ferner wurde das Reaktionsgemisch direkt auf Cellulose-Platten aufgetragen und in 15% HOAc und HOAc - HCl mit Cy 3-B als Referenz chromatographiert. Diese Analysen bestaetigten ebenfalls die Identitaet des gebildeten Produktes als Cy 3-B. Die R_f- und R_t-Werte sind in den Tabellen l und 2 belegt. Zusaetzlich wurde das Produkt durch zeitlich kontrollierte Hydrolyse identifiziert. Der Abbau erfolgte von Cy 3-B zum Cy 3-G und letztlich zum Cy.

Der Rohextrakt enthielt noch Anthocyane, die eine quantitative Auswertung der HPLC-Analyse beeintraechtigen. Deshalb wurde fuer die weiteren Untersuchungen nur der ueber Sephadex G-50 gereinigte Extrakt als Enzymquelle verwendet, obwohl unter Standardbedin-

gungen mit dem gereinigten Extrakt weniger Produkt erhalten wurde. Mit dem G-50-Eluat wurden nur 6 nmol Cy 3-B gebildet, waehrend mit dem Rohextrakt 10 nmol Produkt erhalten wurden. Der Proteingehalt des G-50-Eluat belief sich auf 1 mg Protein / ml Loesung. Um festzustellen, ob die geringere Xylosylierungsaktivitaet dadurch zustande kommt, dass die Xylosyltransferase kein loesliches, sondern ein membrangebundes Enzym ist, wurde eine Mikrosomenpraeparation durch Mg^{2+}- Praezipitation durchgefuehrt (Diesperger et al. 1974).Beim Einsatz des Praezipitats als Enzymquelle wurde kein Umsatz festgestellt. Hingegen fand bei Verwendung des Ueberstandes als Enzymquelle die Xylosylierungsreaktion statt. Das zeigt klar, dass es sich bei der Xylosyltransferase um ein loesliches Enzym handelt. Im Gegensatz zu der 3- und 5-Glucosyltransferase aus Matthiola incana, die ueber Monate bzw. Tage bei -20°C stabil sind, verlor der Extrakt die gesamte Xylosyltransferase-Aktivitaet innerhalb von 48 h, wenn er bei -20° C aufbewahrt wurde. Deshalb wurden alle Untersuchungen mit frisch bereitetem Enzymextrakt durchgefuehrt.

Messungen der Enzymaktivitaet in Abhaengigkeit von der Temperatur zeigten ebenfalls, dass die Xylosyltransferase weniger stabil ist als die anderen Glycosyltransferasen in Matthiola incana. Es wurde ein Temperaturoptimum bei 30°C gefunden. Aber schon bei 40° C sinkt die Enzymaktivitaet zur Haelfte des Optimums ab und erreicht bei 70°C nur 10 % des Optimums. Bei 0°C wird die gleiche Aktivitaet wie bei 40°C gefunden. Das Temperatur-Optimum bei 30°C bedeutet, dass bei hoeheren Temperaturen das Enzym inaktiviert wird. Fuer 3- und 5-Glucosyltransferase wurde die Inaktivierung erst bei Temperaturen festgestellt, die 40 C ueberschritten.

Die Reaktion im Standardtest verlief bis zu einer Inkubationszeit von 13 min linear (Abb. 14). Danach war nur noch ein geringer Anstieg der Biosidbildung zu beobachten. Eine lineare Abhaengigkeit von der Proteinkonzentration wurde bis zu 0.03 mg Protein beobachtet.

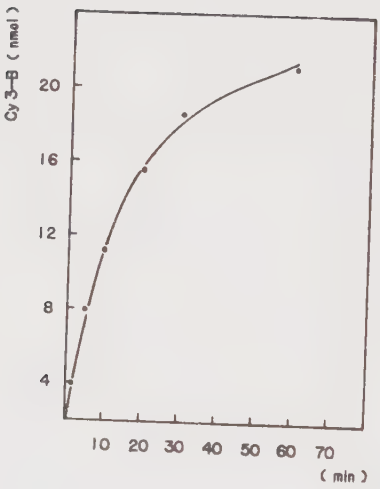


Abb. 14: Zeitabhaengigkeit der Xylosylierung von Cy 3-G

Eine Saettigung des Enzyms mit den Substraten wurde fuer UDP-xylose ab 160 nmol erhalten, waehrend die Reaktion fuer die 3-Glucoside schon mit 40 nmol gesaettigt war. Eine Erhoehung der Konzentration auf 60 nmol fuehrte zu geringen Unterschieden im Umsatz. Wurde die Substratmenge jedoch ueber 60 nmol gesteigert, so fuehrte dies zu einer starken Hemmung (Abb. 15). Fuer den Standardtest wurde die Menge von 40 nmol Cy 3-B als optimal angesehen.

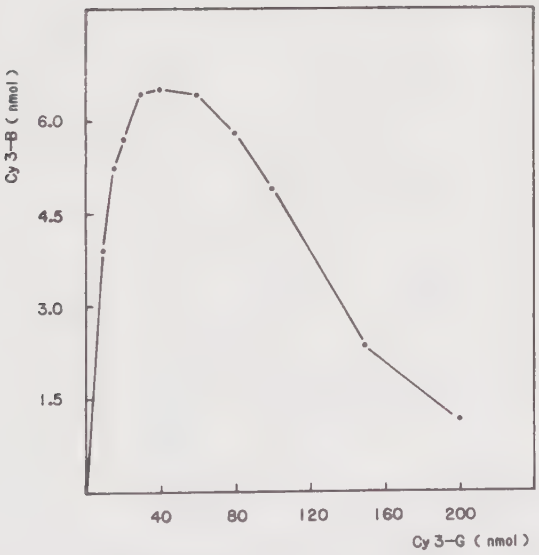


Abb. 15: Abhaengigkeit der Xylosylierung von der Substratkonzentration

Untersuchungen ueber die Abhaengigkeit der Xylosilierungsreaktion vom pH-Wert des Puffers wurden in 0.1 M Kpi und Britton-Robinson (Rauen 1967) durchgefuehrt (Abb. 16). Die Reaktion zeigte in beiden Puffern ein Optimum bei pH = 6.5. Messungen in 0.1 M Tris / HCl deuteten ebenfalls auf ein pH-Optimum im sauren Bereich hin. Bei den verwendeten Puffersystemen fiel auf, dass bei gleichem pH-Wert der beste Umsatz in 0.1 M Kpi erreicht wurde (Abb. 16).

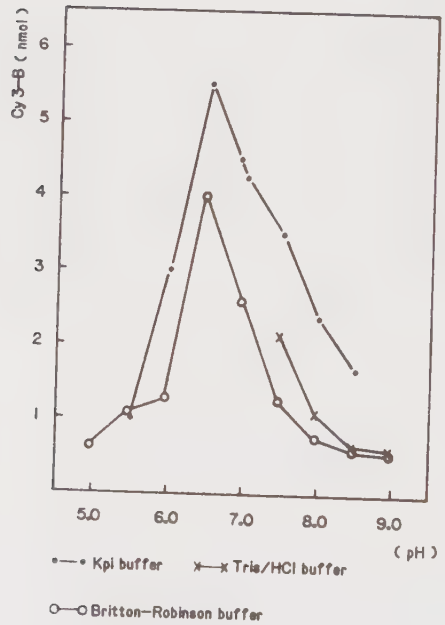


Abb. 16: pH-Abhaengigkeit der Xylosylierung von Cy 3-G in verschiedenen Puffersystemen

Neben UDP-Xylose wurden auch noch andere aktivierte Zucker wie UDP- und TDP-Glucose als Zucker-Donor getestet. Aber von keiner dieser Verbindungen wurde das Zuckermolekuel auf Cy 3-G uebertragen. Die Anheftung eines Zuckermolekuels an die Glucose in 3-Stellung ist tatsaechlich auf Xylose beschraenkt.

Als Substrate fuer die Biosidbildung wurden noch andere Anthocyane geprueft. Die 3-Glucoside von Pg und Dp wurden mit der gleichen Rate xylosyliert wie Cy 3-G. Mit Cy 3.5-D wurde keine Reaktion beobachtet. Waren jedoch die 3-Glucoside mit p-Cumar- oder Kaffeesaeure acyliert, so erfolgte die Biosidbildung mit nahezu totalem Umsatz. Obwohl die acylierten 3-Glucoside die besten Substrate sind, wurde die Xylosylierung mit den 3-Glucosiden als Substrat charakterisiert. Die Instabilitaet und geringe Konzentration von acylierten 3-Glucosiden in Bluetenextrakten verhinderte deren Einsatz als Substrat im Standardtest. Die benuetzten acylierten Verbindungen wurden durch enzymatische Reaktionen hergestellt und reichten nur fuer einige Tests. Als weitere Substrate wurden die 7-Glucoside von Ap, Nar, Eri und DHK eingesetzt. Sie wurden nicht xylosyliert. Ueberraschenderweise wurden die 3-Glucoside von Qu und Km mit der gleichen Rate wie die Anthocyanidin 3-Glucoside in die entsprechenden 3-Sambubioside ueberfuehrt. Die Verbindungen sind bisher nicht in Matthiola-Blueten gefunden worden. Aglyca stellten keine Substrate fuer die Xylosylierungsreaktion dar.

Aufgrund seiner Spezifitaet wird das Enzym als UDP-Xylose: Anthocyanidin-3-O-Glucose-Xylosyltransferase bezeichnet.

Divalente Ionen beeinflussten die Enzymreaktion unterschiedlich (Tab. 14). Nur Ca^{2+} steigerte den Umsatz, alle anderen Ionen

hemmten die Reaktion mehr oder weniger. Cu^{2+}, Fe^{2+}und Zn^{2+} zeigten die staerkste Hemmung. Die komplexierenden Agenzien KCN und EDTA, gaengige Inhibitoren von Enzymen wie p-CMB, DDC und DPC reduzierten die Reaktion ebenfalls. Wurden die Substrate in EGME geloest, so fand keine Reaktion statt. Geringste Mengen wie 0.005 ml EGME in einem Totalvolumen von 0.1 ml verhinderten eine Xylosylierung. Die Hemmung der Reaktion beruht nicht auf einer Zersetzung des Substrats, da es laut HPLC-Analyse in EGME unveraendert vorliegt. Es handelt sich bei EGME tatsaechlich um einen Inhibitor der Enzymreaktion selbst.

Tabelle 14: Einfluss von divalenten Ionen und Inhibitoren auf die Xylosylierung

Substanzen	Xylosyltransferase -Aktivitaet (%)[a]
keine	100
1 mM $CaCl_2$	131
1 mM $MgCl_2$	91
1 mM $MnCl_2$	96
1 mM $CoCl_2$	43
1 mM $ZnCl_2$	36
1 mM $ZnSO_4$	56
1 mM $CuSO_4$	19
1 mM $FeSO_4$	23
1 mM KCN	87
2 mM EDTA	62
2 mM DDC	77
1 mM DPC	65
0.2 mM p-CMB	101

[a] Daten sind Mittelwerte.

3.3.3. Verlauf der Enzymaktivitaet waehrend der Bluetenentwicklung

Der Aktivitaetsverlauf der Xylosyltransferase und die Konzentration von Cy 3-B im Verlauf der Bluetenentwicklung (Stadien s. Kap. 3.2.1.3.) wurde bestimmt. Als Enzym- und Extraktionsquelle dienten jeweils die Petalen aus acht unterschiedlichen Blueten-

stadien.

Der Verlauf der Enzymaktivitaet beschreibt eine ausgepraegte Optimumkurve (Abb. 17). Geringe Aktivitaet ist schon im 1.Stadium nachweisbar (10% des Optimums). Von Stadium 1 steigt die Aktivitaet steil an und erreicht im Stadium 4 ihr Maximum. Von dort faellt sie ab und erreicht im Stadium 8 den gleichen Wert wie in Stadium 1.

Fuer die Cy 3-B-Konzentration wurde ebenfalls eine Optimumkurve ermittelt, die auch in Stadium 4 ihr Maximum besitzt. Die Biosidkonzentration steigt und faellt parallel zum Aktivitaetsverlauf der Xylosyltransferase. Der Abfall in den Stadien 5 - 8 bedeutet, dass Cy 3-B zu hoeher substituierten Anthocyanen metabolisiert wird und kein Endprodukt der Biosynthese darstellt.

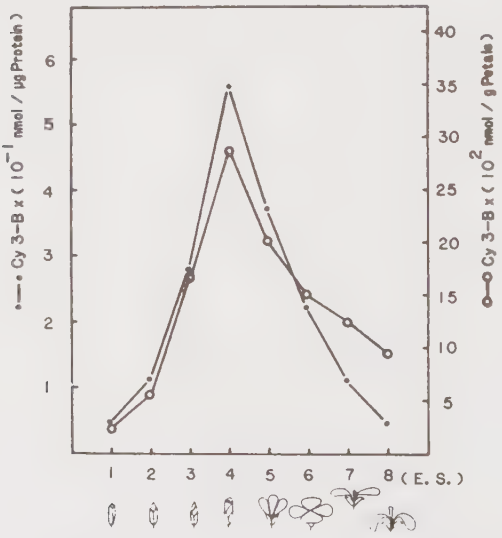


Abb. 17: Verlauf der Enzymaktivitaet waehrend der Bluetenstadien und Akkumulation von Cy 3-B in den entsprechenden Stadien

3.3.4. Genetische Kontrolle

Untersuchungen zur genetischen Kontrolle wurden sowohl mit Cy 3-G als auch mit Cy 3-(p-Coumaroyl)-G als Substrat durchgefuehrt. Es wurden Proteinextrakte aus den Linien 01 - 08 verwendet. Die Ergebnisse sind in Tab. 15 zusammengefasst. Fuer Cy 3-G und Cy 3-(p-Coumaroyl)-G wurden aehnliche Resultate erhalten. Alle Genotypen zeigten Xylosyltransferase-Aktivitaet. Ferner konnte kein Unterschied in der Enzymaktivitaet festgestellt werden, der auf das Vorliegen dominanter bzw. rezessiver Allele am Locus u zurueckzufuehren ist. Hieraus muss geschlossen werden, dass Gen u nicht die Xylosylierung kontrolliert. Die Gene l und v besitzen ebenso keinerlei Effekt auf diese Reaktion.

Tabelle 15: Xylosyltransferase-Aktivitaet in den Linien 01 - 08

Linie	Genotyp (ll/uu/vv)	Xylosyltransferase -Aktivitaet (%)[a]
01	++/++/++	67
02	ll/++/++	83
03	++/uu/++	100
04	++/++/vv	133
05	ll/uu/++	66
06	ll/++/vv	100
07	++/uu/vv	100
08	ll/uu/vv	100

[a] bei gleicher Proteinmenge

Daten sind Mittelwerte.

3.4. Acylierung

Acylierte Anthocyane sind weitverbreitet in der Natur (Harborne 1967, Timberlake und Bridle 1975, Hrazdina 1982). In mehreren Pflanzen sind Gene identifiziert worden, die die Acylierung von Anthocyanen betreffen (Harborne 1967, Seyffert 1960, Kamsteeg et al. 1980c). In Silene dioica wurde erstmals ein Enzym beschrieben, welches die Acylierungsreaktion katalysiert (Kamsteeg et al. 1980c). Diese Acyltransferase katalysiert die Uebertragung von p-Coumaroyl bzw. Kaffeoyl aus den entsprechenden CoA-Estern auf Anthocyandin 3-Rhamnosylglucosid und - 3-Rhamnosylglucosid-5-Glucosid und steht unter der Kontrolle des Gens Ac.

3.4.1. Acylierung in Matthiola incana

In Matthiola incana wurden verschieden acylierte Anthocyane gefunden (Seyffert 1960). Die Acylgruppen leiten sich von den Hydroxyzimtsaeuren ab. Es wurden nur dann acylierte Anthocyane nachgewiesen, wenn an den Loci u und v Wildtypallele vorlagen. Aus diesen Befunden war zu schliessen, dass in den entsprechenden Genotypen Acyltransferase-Aktivitaet vorhanden ist.

Die Anthocyananalyse von methanolischen Extrakten der Linie 06 ergab, dass sie neben geringen Mengen an Cy 3-G und Cy 3-B grosse Mengen an acylierten Anthocyanen besitzt.

Das Elutionsprofil der HPLC-Analyse dieses Extraktes ist in Abbildung 18 gezeigt.

Die Peaks mit den Retentionszeiten 5.3, 5.6 und 5.9 min wurden fraktioniert und die Identitaet der einzelnen Fraktionen bestimmt. Spektren zwischen 250 - 600 nm bewiesen, dass diese Anthocyane mit p-Hydroxyzimtsaeuren acyliert sind, da zwischen 315 - 325 nm zusaetzliche Maxima erscheinen, die typisch fuer die Hydroxyzimtsaeuren sind. Durch alkalische Hydrolyse wurden die Zimtsaeurederivate abgespalten und HPLC- und DC-Analysen des Gemischs zeigten aus welchen Komponenten sich die einzelnen Peaks zusammensetzten.

Die Linie 06 enthaelt als acylierte Anthocyane Cy 3-(Kaffeoyl)-Sambubiosid, - 3-(p-Coumaroyl)-Sambubiosid, -3-(Kaffeoyl)-Glucosid und - 3-(p-Coumaroyl)-Glucosid, wobei der Anteil des Cy 3-(p-Coumaroyl)-Sambubiosid mit 60% am hoechsten war (Abb. 18). Aus dem Grund wurden Cy 3-G und Cy 3-B als Substrate fuer die Acylierung eingesetzt, wobei fuer die Standardtests Cy 3-B bevorzugt wurde.

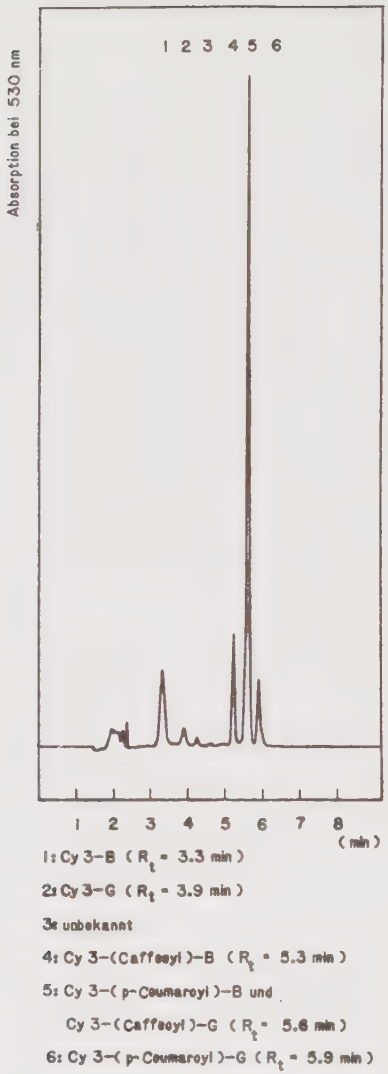


Abb. 18: HPLC-Analyse der methanolischen Bluetenextrakte von Matthiola incana Linie 06

3.4.1.1. Pflanzenmaterial

In die Untersuchungen wurden die Linien 01 - 08 von Matthiola incana einbezogen, die schon in Kap. 3.1.2.3 ausfuehrlich charakterisiert worden (Tab. 8).

3.4.1.2. Nachweis und Charakterisierung des Enzyms

Nach Inkubation von Enzymextrakten aus Blueten der Linie 06 mit Cy 3-B und p-Cumaroyl-CoA wurde im HPLC-Diagramm ein neues Produkt entdeckt, dessen Retentionszeit 5.6 min betraegt, und somit den gleichen R_t-Wert besitzt, wie dass aus methanolischen Bluetenextrakten als Cy 3-(p-Coumaroyl)-B identifizierte Anthocyan. Die HPLC-Trennungen wurden fraktioniert und die Fraktion mit der Retentionszeit von 5.6 min wurde in 15% HOAc und BAW auf Cellulose-Platten und in EtOAc - HCOOH auf Kieselgel-Platten mit Cy 3-(p-Coumaroyl)-B aus 06 chromatographiert und als solches identifiziert. Die R_f-Werte sind in Tab. 1 zusammengefasst. Das Reaktionsgemisch wurde auch direkt in den genannten Fliessmitteln mit der Referenz chromatographiert. Es wurde das gleiche Ergebnis erhalten. Zur eindeutigen Identifizierung erfolgten noch alkalische Hydrolyse und die Aufnahme von Spektren zwischen 250 - 600 nm.

Fuer die Standardtests wurde wiederum der durch Sephadex G-50 gereinigte Enzymextrakt verwendet, da im Rohextrakt noch Anthocyane enthalten waren, die durch die Reinigung entfernt wurden. Im Gegensatz zu Silene dioica (Kamsteeg et al. 1980c) unterschieden sich bei Matthiola incana die Acyltransferase-Aktivitaeten im Rohextrakt und G-50-Eluat nicht. Der Proteingehalt des G-50-

Eluat betrug 1 mg Protein / ml Loesung. Bei -20 °C konnte der Enzymextrakt eine Woche ohne nennenswerten Aktivitaetsverlust aufbewahrt werden.

Messungen der Temperaturabhaengigkeit der Reaktion ergaben eine Optimumkurve, deren Maximum bei 30°C liegt. Selbst bei 0°C ist Aktivitaet vorhanden, sie betraegt ca. 15% des Maximums. Von 0°-30 °C ist ein kontinuierlicher Aktivitaetsanstieg zu beobachten und ab 30°C ein Abfall der staerker ist als der Anstieg. Bei 50°C wird der gleiche Wert erreicht wie bei 0 ° C. Berechnungen der Aktivierungsenergie ergaben zwischen 0 ° C und 10 ° C einen Wert von 70 kJ / mol, 10°- 30°C 91 kJ / mol und ab 30°C sinkt sie auf 11 kJ / mol.

Linearitaet in Abhaengigkeit von der Zeit konnte bis 15 min beobachtet werden und Linearitaet in Abhaengigkeit von der Proteinmenge bis zu 0.03 mg Protein.

Untersuchungen zur Abhaengigkeit der Reaktion vom pH-Wert des Puffers ergaben ein Optimum bei pH = 6.5 in 0.1 M Kpi. Bei pH 6.0 und 7.7 wurde halbmaximale Aktivitaet bestimmt (Abb. 19).

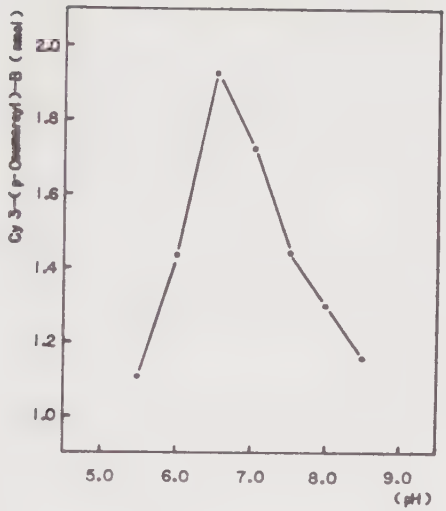


Abb. 19: pH-Abhaengigkeit der Acylierung von Cy 3-B mit p-C-CoA

Eine Saettigung der Acylierung mit dem CoA-Ester wurde schon ab 15 nmol erreicht. Eine Vergroesserung der Konzentration um das 10 fache fuehrte weder zu einer Steigerung noch zu einer Hemmung der Reaktion. Hingegen zeigte sich fuer die Anthocyankomponente wieder eine starke Hemmung beim Ueberschreiten eines bestimmten Wertes. Gesaettigt war die Acylierungsreaktion ab 30 nmol Anthocyan und ab 90 nmol trat eine Hemmung ein.

Untersuchungen der Substratspezifitaet ergaben, dass auch Kaffeeoyl-CoA ein guter Acyl-Donor ist. Der Umsatz betrug ca. 50% des Umsatzes mit p-Cumaroyl-CoA. Mit Feruloyl-CoA war ebenfalls eine Reaktion zu beobachten. Hingegen fand keine Umsetzung mit den CoA-Estern von Sinapin-, Isoferula-, Zimt- und 4-Methoxyzimtsaeure statt. CoA-Ester aliphatischer Carbon- und Dicarbonsaeuren wie Acetyl-, Malonyl-, Succinyl- und Glutaryl-CoA wurden nicht als Acylgruppen angenommen.

Ausser Cy 3-B wurde auch Cy 3-G acyliert. Mit Cy 3-G und p-Coumaroyl-CoA bzw. Kaffeoyl-CoA wurde sogar der doppelte Umsatz gegenueber Cy 3-B erreicht. Ueberraschender Weise wurde fuer Cy 3-G auch Sinapinsaeure als Acylgruppe akzeptiert. Die 3-Glucoside von Pg und Dp wurden mit der gleichen Reaktionsrate umgesetzt wie Cy 3-G, und fuer Pg 3-B wurde die gleiche Umsatzrate gefunden wie fuer Cy 3-B. Hingegen fand keine Acylierung bei Cy 3.5-D und Cy 3.5-T statt. Auch die Verwendung verschiedener CoA-Ester veraenderte dieses Resultat nicht.

Das Enzym wird demnach als Hydroxyzimtsaeure-CoA-Ester: Anthocyan-Hydroxyzimtsaeuretransferase bezeichnet.

Die Acylierungreaktion ist aeusserst empfindlich gegenueber Inhibitoren wie p-CMB, DPC, DDC und zweiwertigen Ionen. Mit Ausnahme der zweiwertigen Ionen der Erdalkalimetalle Mg und Ca fuehrten saemtliche Zusaetze zu einer teilweise drastischen Reduktion der Enzymaktivitaet (Tab. 16). Wie bei Silene dioica wurde kein Ion gefunden, das die Reaktion stimuliert (Kamsteeg et al. 1980c).

Tabelle 16: Einfluss von divalenten Ionen und Inhibitoren auf die Acyltransferase

Substanzen	Acyltransferase-Aktivitaet (%)[a]
keine	100
1 mM $MgCl_2$	90
1 mM $CaCl_2$	98
1 mM $MnCl_2$	89
1 mM $CoCl_2$	44
1 mM $FeSO_4$	14
1 mM $CuSO_4$	19
1 mM $ZnSO_4$	16
1 mM $ZnCl_2$	18
1 mM EDTA	77
1 mM KCN	82
1 mM DPC	89
2 mM DDC	69
0.2 mM p-CMB	37

[a] Daten sind Mittelwerte.

3.4.1.3. Verlauf der Enzymaktivitaet waehrend der Bluetenentwicklung

Wie fuer die anderen modifizierenden Enzyme wurde auch die Acyltransferase-Aktivitaet in den 8 Bluetenstadien untersucht. Bestimmungen der Acyltransferase-Aktivitaet fuehrten zu einer Opti-

mumkurve (Abb. 20). Von Stadium 1 steigt sie kontinuierlich bis zum Stadium 5 an und faellt von dort wieder ab und erreicht in Stadium 7 die gleiche Hoehe wie in Stadium 1. Messungen der Konzentration von acyliertem Cy 3-B in den jeweiligen Stadien zeigten einen anderen Kurvenverlauf. Die Konzentration steigt parallel zur Vergroesserung der Enzymativitaet an, erreicht in Stadium 5 das Maximum, jedoch faellt sie nicht so stark wie die Enzymaktivitaet, sondern sinkt in den spaeteren Stadien schwach ab. Das deutet darauf hin, dass die acylierten Cy 3-B in der Linie 06 ein Endprodukt der Anthocyanbiosynthese sind und nicht weiter umgesetzt werden.

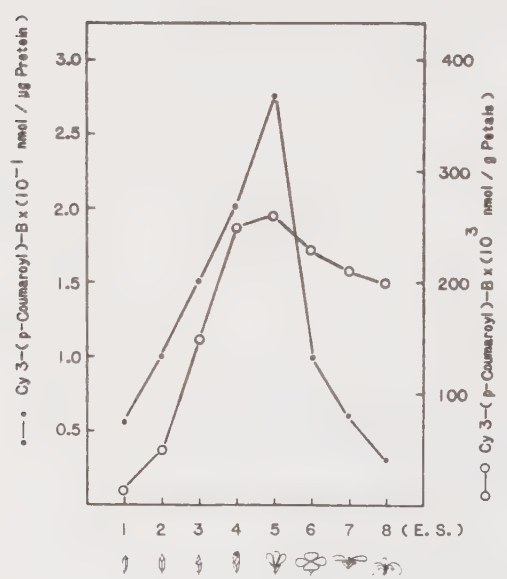


Abb. 20: Verlauf der Enzymaktivitaet waehrend der Bluetenstadien und Akkumulation von acyliertem Cy 3-B in den entsprechenden Stadien

3.4.1.4. Genetische Kontrolle

Die enzymatische Synthese von acyliertem Cy 3-B und Cy 3-G gelang mit Proteinextrakten aus allen Genotypen mit Wildtypallelen des Gens u (Tab. 17). Alle Linien mit rezessiven Allelen am Locus u wiesen keinerlei Acyltransferase-Aktivitaet auf. Mischinkubationen bewiesen, dass das Fehlen von Acyltransferase-Aktivitaet nicht auf die Existenz von loeslichen Suppressoren in Mutanten mit rezessiven Allelen zurueckzufuehren ist. Die Enzymaktivitaet in den Mischexperimenten aus Genotypen mit dominanten und rezessiven Allelen am Locus u verhielt sich additiv.

Tabelle 17: Acyltransferase-Aktivitaet in den Linien 01 - 08

Linie	Genotyp (ll/uu/vv)	Acyltransferase -Aktivitaet (%)[a]
01	++/++/++	110
02	ll/++/++	100
03	++/uu/++	0
04	++/++/vv	90
05	ll/uu/++	0
06	ll/++/vv	100
07	++/uu/vv	0
08	ll/uu/vv	0

[a] bei gleicher Proteinmenge

Daten sind Mittelwerte.

Die Acylierungsaktivitaet ist unabhaengig von Gen l und ueberraschenderweise auch von Gen v, obwohl aus chemogenetischen Untersuchungen geschlossen wurde, dass Gen v die Acylierung ebenfalls kontrolliert. Es wurde aber keine Acylierungsaktivitaet in den Linien gefunden, die rezessiv bzgl. Gen u und dominant bzgl. Gen v sind. Auch bei Verwendung von Cy 3.5-T und Cy 3.5-D als Substrat konnte keine von Gen v kontrollierte Acylierungsaktivitaet beobachtet werden.

3.4.2. Acylierung in Callistephus chinensis

Wie schon in Kap. 3.2.2.1. beschrieben, kommen in den anthocyanbildenden Linien je nach Vorliegen dominanter bzw. rezessiver Allele am Locus M Anthocyanidin 3.5-Diglucoside bzw. - 3-Glucoside vor. Allen diesen Linien ist gemeinsam, dass neben den reinen Glycosiden auch acylierte Glucoside nachgewiesen werden koennen (Forkmann 1977b, Teusch 1984). Inhaltsstoffanalysen fuehrten zu dem Schluss, dass es sich bei der Acylgruppe um eine aliphatische Saeure handelt (Forkmann 1977b). Neuere Analysen ueber die Acylgruppe wiesen nach, dass es sich um Malonsaeure handelt (Takeda et al. 1986). Die Bildung von malonylierten Glycosiden mit Enzympraeparationen aus Petalen von Callistephus chinensis war Gegenstand der nachfolgenden Untersuchungen.

3.4.2.1. Pflanzenmaterial

Zur Charakterisierung der Acylierungsreaktion in Callistephus chinensis wurden Enzymextrakte der Linien O3, O4 und O6, die in Kap. 3.2.2.1. beschrieben sind, verwendet.

3.4.2.2. Nachweis und Charakterisierung des Enzyms

Inkubation von Malonyl-CoA und Pg 3-G mit dem Rohextrakt von Bluetenblaettern von Callistephus chinensis fuehrte zur Bildung eines Produktes, das im HPLC-Diagramm eine hoehere Retentionszeit als das Substrat Pg 3-G aufweist. Das Produkt wurde durch HPLC- und DC-Analyse in BAW und alkalische Hydrolyse als Pg 3-(Malonyl)-G identifiziert. Der Rohextrakt enthielt noch Anthocyane wie z.B. Pg 3-G. Um eine zweifelsfreie Quantifizierung des Reaktionsgemisches zu gewaehrleisten, mussten die endogenen Substrate ent-

fernt werden. Diese Reinigung erfolgte wieder durch eine Sephadex G-50-Saeule. Es wurde keine Aktivitaetsdifferenz zwischen dem Rohextrakt und dem gereinigten Extrakt festgestellt. Der durch die Saeule gereinigte Extrakt wurde bei allen nachfolgenden Untersuchungen benutzt. Das G-50-Eluat enthielt 0.2 mg Protein / ml Loesung und liess sich ohne Zusatz bei -20°C mehrere Wochen ohne Aktivitaetsverlust aufbewahren. Erst nach 6 Wochen waren nur noch 60% der Anfangsaktivitaet vorhanden. Enzympraeparationen aus unter Stickstoff eingefrorenen und bei -70°C aufbewahrten Petalen zeigten die gleiche Umsatzrate wie Praeparationen aus frischen Material.

Auch die Messungen der Umsatzrate in Abhaengigkeit von der Temperatur deuteten an, dass das Enzym, welches die Acylierung katalysiert relativ unempfindlich ist (Abb. 21). Bis 50° C ist es weitgehend stabil und die Reaktion besitzt dort ein Maximum, bei 30°C und 80°C zeigt die Reaktion halbmaximalen Umsatz. Selbst bei 0°C erfolgt eine Reaktion, die 17% des Maximums betraegt.

Die Unempfindlichkeit des Enzyms selbst war von grossem Vorteil, da das Produkt, das malonylierte Pg 3-G, sich schnell wieder zersetzt.

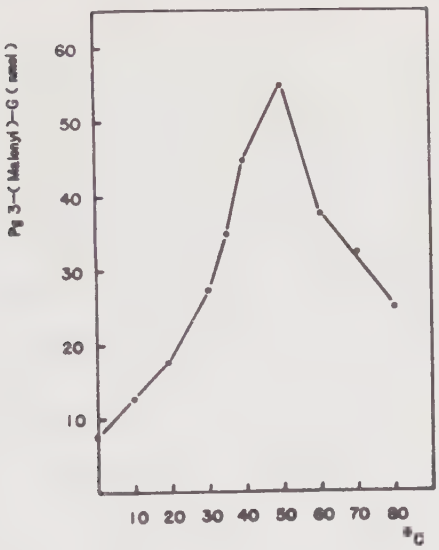


Abb. 21: Temperaturabhaengigkeit der Acylierung von Pg 3-G mit Malonyl-CoA

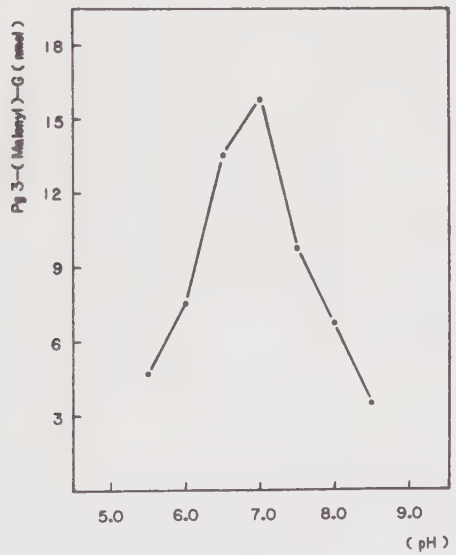


Abb. 22: pH-Abhaengigkeit der Acylierung von Pg 3-G mit Malonyl-CoA

Fuer die Synthese von malonyliertem Pg 3-G wurde eine lineare Abhaengigkeit von der Inkubationszeit bis 15 min und von der zugefuegten Proteinmenge bis 0.005 mg beobachtet.

Die Reaktion besitzt in 0.1 M Kpi ein pH-Optimum bei pH = 7.0 (Abb. 22). Dieser pH-Wert wurde als Standardbedingung gewaehlt, jedoch mit einer geringeren Salzkonzentration von 0.05 M Kpi. Die Umsatzrate war in beiden Salzkonzentrationen gleich.

Das Enzym war ab 70 nmol mit Malonyl-CoA gesaettigt. Eine 10 - bzw. 25-fache Erhoehung der Konzentration zeigte keinen Effekt auf die Reaktionsrate. Mit Pg 3-G war das Enzym ab 50 nmol gesaettigt, jedoch wurde es ab 140 nmol Substrat stark gehemmt. Bei diesem Wert betrug die Umsatzrate nur mehr 70% der "Optimalkonzentration". Die Hemmung ist sicherlich nicht auf eine Verunreinigung von Pg 3-G zurueckzufuehren, da sie laut HPLC nur 1 - 2% betraegt.

Aufgrund seiner Spezifitaet wird das Enzym als Dicarbonsaeure-CoA-Ester: Anthocyan-Dicarbonsaeuretransferase bezeichnet.

Durch Zugabe von p-CMB, DPC und DDC wurde die Reaktion gehemmt. Zweiwertige Ionen inhibierten ebenfalls, wobei Co^{2+} die geringste Hemmung und Cu^{2+} die staerkste Hemmung verursachte. Die komplexierenden Agenzien KCN und EDTA wirkten ebenfalls reduzierend auf die Umsatzrate (Tab. 18).

Tabelle 18: Einfluss von divalenten Ionen und Inhibitoren auf die Acyltransferase-Aktivitaet

Substanzen	Acyltransferase -Aktivitaet (%)[a]
keine	100
1 mM $CaCl_2$	80
1 mM $MgCl_2$	86
1 mM $MnCl_2$	72
1 mM $CoCl_2$	91
1 mM $CuSO_4$	20
1 mM $FeSO_4$	55
1 mM $ZnCl_2$	63
1 mM $ZnSO_4$	54
1 mM KCN	74
2 mM EDTA	66
1 mM DPC	55
2 mM DDC	64
0.2 mM p-CMB	36

[a] Angaben sind Mittelwerte.

Die Synthese von malonylierten 3-Glucosiden von Cy und Dp gelang ebenfalls mit den erwaehnten Enzymextrakten . Die aufgefuehrten 3-Glucoside sind aequivalente Substrate fuer die Acyltransferase. Die 3.5-Diglucoside von Pg, Cy und Dp hingegen stellten wesentlich schlechtere Substrate dar. Ihre Acylierungsrate betrug nur 10% verglichen mit der der 3-Glucoside. Mit 3-Sambubiosiden als

Substrat wurde wie erwartet keine Reaktion beobachtet, sie kommen auch nicht in Callistephus chinensis vor.

Neben Malonyl-CoA wurden noch weitere CoA-Ester als Acyl-Donoren geprueft. Als Vertreter der Hydroxyzimtsaeuren wurden die CoA-Ester von p-Cumar- und Kaffeesaeure eingesetzt. Es fand keine Reaktion statt. Stellvertretend fuer die Gruppe der Carbonsaeuren wurden Acetyl- und n-Propionyl-CoA verwendet. Auch mit diesen CoA-Estern wurde keine Acylierung beobachtet. Von den Dicarbonsaeuren wurden noch Methylmalonyl-, Succinyl- und Glutaryl-CoA als Acyl-Donoren eingesetzt. Mit allen wurde Acylierung von Pg 3-G beobachtet. Jedoch war Malonyl-CoA die beste Gruppe. Mit laenger werdenden CH_2 -Ketten wurde der Umsatz schwaecher, pro CH_2 -Einheit um ca. 30%. Mit Methylmalonyl-CoA betrug die Reaktionsrate nur 30% von Malonyl-CoA als Acyl-Donor. Das bedeutet, dass in Callistephus chinensis nur Dicarbonsaeuren als Acylierungsgruppe angenommen werden. Allerdings konnte die maximale CH_2 -Kettenlaenge bei der noch Acylierung stattfindet nicht bestimmt werden, da die entsprechenden CoA-Ester nicht zur Verfuegung standen.

Obwohl 3.5-Diglucoside schlechte Substrate fuer die Acylierung sind, duerfte doch die Acylierung der letzte Schritt in der Synthese von acylierten Anthocyanidin 3.5-Diglucosiden sein. Experimente, hinsichtlich der Reihenfolge der Syntheseschritte ergaben, dass eine 5-Glucosidierung unmoeglich ist, wenn schon acyliert ist. Hingegen ist der Weg, dass zuerst in 5-Position glucosidiert wird und dann acyliert wird, gangbar.

4. DISKUSSION

Die Aufklaerung der Anthocyanbiosynthese begann mit isotopenmarkierten Vorstufen. Auf diese Weise wurden Erkenntnisse ueber Bausteine der Flavonoide und den biogenetischen Zusammenhang der Flavonoidklassen gewonnen (Grisebach und Barz 1969). Um jedoch eindeutige Aussagen ueber die Art und Reihenfolge der einzelnen Biosyntheseschritte zu erhalten, war es erforderlich, die Untersuchungen auf enzymatische Ebene zu verlegen. Zunaechst dienten Zellkulturen als Ausgangsmaterial (Ebel et al. 1974, Heinzmann et al. 1977, Noé et al.1980, Wellmann et al. 1976). Aus den in vitro nachgewiesenen Enzymaktivitaeten konnte nicht sogleich geschlossen werden, dass das Enzym auch in vivo fuer den entsprechenden Reaktionsschritt verantwortlich ist. Durch die Verwendung genetisch definierter Mutanten konnte Aufschluss ueber die Kontrolle und die Auswirkung des Enzyms auf die Anthocyanbiosynthese gewonnen werden.

Mit Hilfe genetisch definierter Pflanzen konnten in den vergangenen Jahren einige Schritte in der Anthocyanbiosynthese (s. Abb. 2) selbst aufgeklaert werden (Kamsteeg et al. 1978a, 1978b, Kuhn et al. 1978, Forkmann und Dangelmayr 1979, Kamsteeg et al. 1980a, 1980b und 1980c, Spribille und Forkmann 1981, 1982a und 1982b, Stotz und Forkmann 1981 und 1982, Forkmann und Stotz 1981, Jonsson et al. 1984a, Stotz et al. 1985, Froemel et al. 1985). An unserem Institut steht fuer verschiedene Pflanzengattungen eine Reihe definierter Genotypen zur Verfuegung.

Nachdem die Anthocyanidine gebildet sind, erfahren sie durch Glycosidierung in 3-Position eine Stabilisierung. Durch weitere

Glycosidierungen in anderen Positionen, zusaetzliches Anhaengen von Glycosiden an bereits vorhandene Zuckermolekuele und Acylierung der Zuckermolekuele werden die Anthocyanidin 3-glucoside in vielfaeltiger Weise modifiziert.

Bei den Bluetenpflanzen wie Petunia hybrida (Jonsson et al. 1984b) und Silene dioica (Kamsteeg et al. 1978a und b, 1980a, b und c) konnten einzelne Reaktionen der Anthocyanmodifizierung charakterisiert und deren genetische Kontrolle teilweise bestimmt werden.

Ziel dieser Arbeit war es die Stabilisierung und Modifizierung in Matthiola incana und Callistephus chinensis zu charakterisieren. Die einzelnen Reaktionen werden im Folgenden getrennt nach den beiden Pflanzengattungen und nach Enzymen diskutiert.

4.1. Matthiola incana

4.1.1. 3-Glucosidierung

Nachdem in verschiedenen Pflanzen eine 3 GT charakterisiert worden war, wurde dieses Enzym auch in Matthiola incana 1982 von Dangelmayr gefunden (Dangelmayr 1982). In Anlehnung an die Untersuchungen von Dangelmayr (Dangelmayr et al. 1983) wurden Blueten des Stadiums 4 der Bluetenentwicklung als Enzymquelle verwendet, da hier die 3 GT in Abhaengigkeit von der Bluetenentwicklung ein deutliches Maximum zeigt. Auch der Anthocyangehalt der Bluete erreicht erst ab diesem Stadium ein maximales Niveau.

Die hohe Aktivitaet der 3 GT war fuer die Messungen von Vorteil.

Innerhalb weniger Minuten wurden sichtbare Mengen an 3-Glucosiden gebildet, so dass die Reaktionsrate durch den Zerfall der Anthocyanidine nur schwach beeinflusst wurde. Das Reaktionsgemisch konnte durch die HPLC relativ einfach quantifiziert werden. Nur fuer die genaue Quantifizierung der Umsatzraten zwischen den Anthocyanidinen und Flavonolen waren Untersuchungen mit ^{14}C-markierter UDP-Glucose erforderlich.

Die Bestimmung der pH-Abhaengigkeit in 0.1 M Kpi- und Britton-Robinson-Puffer zeigte ein klares Maximum im alkalischen Bereich. Fuer Pelargonidin wurde das Optimum bei pH = 8.5 und fuer Quercetin bei pH = 9.5 gemessen. Aehnlich hohe pH-Optima der 3 GT wurden in anderen Pflanzen beschrieben (Kho et al. 1978, Saleh et al. 1976a, Saleh et al. 1976b). Die Differenz der Optima bei den beiden Substraten ist auf deren unterschiedliche Bestaendigkeit unter alkalischen Bedingungen zurueckzufuehren. Waehrend Quercetin weitgehend stabil ist, zerfaellt Pelargonidin sehr schnell. Diese Unbestaendigkeit des Pg war auch der Grund, das pH-Optimum nicht als Standardbedingung zu waehlen, sondern einen pH von 7.0, da sonst die schnellere Zersetzung des Pg zu Verzerrungen bei der Quantifizierung gefuehrt haette. Fuer die Studien mit Qu als Substrat wurde ebenfalls ein pH von 7.0 gewaehlt, um den direkten Vergleich mit Pg zu ermoeglichen.

Das breite pH-Optimum, was in frueheren Untersuchungen gemessen wurde, kam durch nicht optimale Testbedingungen zustande wie z.B. zu lange Inkubationszeit, keine Substratsaettigung und zu hohe Proteinmengen.

Die starke Substrathemmung, die sowohl fuer Pg als auch fuer Qu beobachtet wurde, wird nicht durch Verunreinigung der Substrate verursacht. Ein Vergleich zwischen dem Einsatz der kaeuflich erwobenen und der HPLC gereinigten Substanz zeigte keine Unterschiede in den Reaktionsraten. Eine starke Substrathemmung wurde ebenfalls bei Rotkraut-Keimlingen (Saleh et al. 1976b) und Happlopappus (Saleh et al. 1976a) beobachtet. Hingegen wurde in Silene dioica (Kamsteeg et al. 1978a) und Petunia hybrida (Kho et al. 1978, Gerats et al. 1982) keine Hemmung festgestellt. Untersuchungen der Abhaengigkeit der Reaktion von divalenten Ionen, Enzyminhibitoren und komplexierenden Agenzien zeigten, dass die Reaktion durch Zugabe von zweiwertigen Ionen nicht wesentlich stimuliert werden kann. Komplexierende Agenzien beeinflussen kaum, waehrend Fe^{2+} und Cu^{2+} betraechtliche Hemmung zur Folge haben. Moeglicherweise bilden sich Metall-Anthocyanidin-Komplexe, wie sie schon in der Literatur beschrieben wurden (Hayashi und Takeda 1970, Takeda und Hayashi 1977, Takeda 1977, Takeda et al. 1984). Eine andere Erklaerung fuer diesen Sachverhalt waeren Redox-Reaktionen, die zur Reduzierung des Anthocyanidins und zur Oxidation des Ions fuehren. Diese Moeglichkeit ist insofern plausibel, als Fe^{3+} keinerlei Einfluss ausuebt. Die Effekte der jeweils zugegebenen Substanzen auf die 3-Glucosidierungsreaktion von Pg und Qu waren aehnlich.

In Uebereinstimmung mit der 3 GT aus anderen Pflanzen beschraenkt sich auch das Enzym in Matthiola incana auf die Anthocyanidine und Flavonole als Substrate. Es ist erwaehnenswert, dass weder die Dihydroflavonole noch die Leucoanthocyanidine (Heller und

Forkmann, unveroeffentlicht) in 3-Stellung glucosidiert werden. Das legt die Vermutung nahe, dass die Glucosidierung tatsaechlich auf Anthocyanidin-Ebene stattfindet und somit der letzte Schritt in der Anthocyanidinbiosynthese selbst ist (Grisebach 1962, Fritsch und Grisebach 1975).

Da die 3 GT Flavonole und Anthocyanidine als Substrat akzeptiert, wurde zunaechst die Frage aufgeworfen, ob es sich um eine oder zwei 3-Glucosyltransferasen handelt. Genauere Untersuchungen zu diesem Problem wurden an Petunia hybrida durchgefuehrt mit dem Ergebnis, dass Flavonole und Anthocyanidine von demselben Enzym in 3-Stellung glucosidiert werden (Jonsson et al. 1984a).

In Matthiola incana sprechen die Ergebnisse ebenfalls fuer ein einziges Enzym. Die Reduktion der 3 GT-Reaktion in den verschiedenen Mutanten ist aehnlich fuer Pg und Qu als Substrat. Der Einfluss der getesteten Inhibitoren und Ionen ist ebenfalls gleich. Ferner wird fuer die Reaktion mit den beiden Substraten die gleiche Temperatur-, Protein- und Substrat-Abhaengigkeit gemessen. Ebenso sind die Inaktivierungskurven als Funktion der Zeit bei verschiedenen Temperaturen gleich. Lediglich die pH-Optima unterscheiden sich. Aber dies ist offensichtlich auf die unterschiedliche Stabilitaet der Substrate selbst zurueckzufuehren.

Die 3 GT ist ein sehr stabiles und hochaktives Enzym wie die Lagerung ohne Aktivitaetsverlust, die geringe Temperaturempfindlichkeit und die schnelle Produktbildung beweisen. Da durch die 3-Glucosidierung die gebildeten Anthocyanidine erst stabilisiert werden, ist die 3 GT als ein Enzym anzusehen, das einen Schritt in der Anthocyanbiosynthese selbst katalysiert und nicht als ein

Enzym, das eine Modifikationsreaktion kontrolliert.

Linien von Matthiola incana, die rezessive Allele der Gene e, g und z, die in der Anthocyanbiosynthese nach der Bildung der Dihydroflavonole eingreifen, besitzen reduzierte 3 GT-Aktivitaet. Die Reduktion war fuer Pg und Qu als Substrat aehnlich. Wie erwartet wurden nur geringe Unterschiede zwischen den Genotypen gefunden, die sich in den Allelen des Locus b unterscheiden. Diese Differenzen liegen im Bereich statistischer Schwankungen. Auch an Silene dioica (Kamsteeg et al. 1978a) und Petunia hybrida (Kho et al. 1978, Gerats et al. 1983) konnte gezeigt werden, dass rezessive Mutanten von Genen, die Reaktionen betreffen, die zwischen den Dihydroflavonolen und Anthocyanidinen liegen, deutlich reduzierte 3 GT-Aktivitaet aufweisen.Wie schon in diesen beiden Pflanzen wurde auch bei Matthiola incana in keiner Linie der totale Ausfall der 3 GT gemessen. Keines der Gene e, g und z kann daher als Strukturgen fuer die 3 GT betrachtet werden. Kuerzlich wurde nachgewiesen, dass Gen e die Reduktase kontrolliert (Heller et al. 1985b). Das Enzym katalysiert die Reduktion der Dihydroflavonole zu den Flavan 3.4-Diolen (Heller et al. 1985b). Die Aktivitaet der Dihydroflavonol-4-Reduktase wird aber auch durch das Gen g kontrolliert (Heller et al.1985b). So fehlt Linie 19, die 4-Reduktase-Aktivitaet, obwohl sie dominante Allele des Gen e besitzt, und Linie 24 mit den Allelen $g^{l}g^{l}e^{+}e^{+}$ weist reduzierte Enzymaktivitaet auf (Forkmann, unveroeffentlicht) . Fuer die 3 GT wurden aehnliche Verhaeltnisse festgestellt. Liegen rezessive Allele des Gens g vor, so ist die 3 GT auf 5 - 10% des Wildtyp-Wertes reduziert. Mit Allel g^{l} (Linie 24) wird eine geringere

Reduktion (ca. 20%) beobachtet und noch Anthocyan synthetisiert. Genotypen mit dominanten Allelen am Locus g und ohne weitere Mutationen wiesen Wildtyp-Aktivitaet auf. Sind jedoch rezessive Allele an den Loci z oder e vorhanden, so ist die 3 GT-Aktivitaet je nach Zustandes des Gens g verschieden reduziert. Liegen nur am Gen z rezessive Allele vor, so wird noch Anthocyan gebildet (Linie 27 und 25), jedoch ist die 3 GT-Aktivitaet auf 25 - 30% reduziert. Sind zusaetzlich am Locus g die Allele g'g' vorhanden, so ist die 3 GT noch staerker reduziert (10%). Interessanterweise werden jetzt ueberhaupt auch keine Anthocyane gebildet (Linie 28 und 29).

In den weissbluehenden Linien kann die Reduktion der 3 GT-Aktivitaet nicht fuer die Unterbrechung in der Anthocyanbiosynthese verantwortlich gemacht werden. Die verbleibende Aktivitaet von ca. 20% duerfte fuer die Bildung von Anthocyanen ausreichen, wie die Linien 24 - 27 zeigen. Vielleicht gibt es einen Grenzwert fuer die 3 GT-Aktivitaet. Beim Unterschreiten des Wertes ist keine Anthocyansynthese mehr moeglich, da die Anthocyanidine nicht genuegend schnell stabilisiert werden koennen. Liegt hingegen die 3 GT-Aktiviatet ueber dem Grenzwert, so ist die Anthocyansynthese meoglich. Wahrscheinlich ist auszuschliessen, dass die Existenz von Flavonolen die Anthocyansynthese dadurch stoert, dass die 3 GT nur die besseren Substrate, die Flavonole, glucosidiert und somit die Stabilisierung der Anthocyanidine beeintraechtigt. Die durchgefuehrten Tests beweisen, dass die Bildung von 3-Glucosiden der Flavonole und Anthocyanidine nebeneinander im gleichen Testansatz moeglich ist. Ferner enthalten auch die Wildtyplinien Flavonole und dort ist bekanntlich Anthocyansynthese in

hohem Masse moeglich. Zudem ist die Flavonolsynthese zu dem Zeitpunkt schon beendet, wenn die Hauptmasse der Anthocyanidine gebildet wird (Spribille und Forkmann 1984).

Die Annahme, dass die 3 GT-Aktivitaet erst durch das Substrat induziert wird, muss ebenfalls verworfen werden. Linie 18, deren Flavonoidsynthese durch den Ausfall der Chalkon-Synthase blokkiert ist, zeigt nahezu die gleiche 3 GT-Aktivitaet wie der Wildtyp (Linie 08 und 16). Dies beweist, dass weder Anthocyanidine noch andere Zwischenprodukte die 3 GT-Reaktion induzieren.

Da bisher noch fuer keine Pflanze eine Mutante gefunden wurde, bei der die 3 GT-Aktivitaet gaenzlich fehlt, ist die Hypothese moeglich, dass die Anthocyanidine selbst schaedigend auf die Zelle wirken koennen und somit die hohe Aktivitaet der 3 GT fuer eine vollstaendige "Entgiftung" sorgt, indem sie die Anthocyanidine in die 3-Glucoside ueberfuehrt. Ferner legt der Einfluss mehrerer Gene auf die 3 GT-Aktivitaet in Matthiola incana und anderen Pflanzen die Vermutung nahe, dass die Enzyme, die die letzten Schritte der Anthocyanbiosynthese kontrollieren, zu einem funktionellen Komplex vereint sind, so dass ein Defekt eines Enzyms die uebrigen Enzyme in ihrer Aktivitaet hemmt. Solange jedoch ueber die letzten Schritte der Anthocyanbiosynthese von den Leucoanthocyanidinen zu den Anthocyanidinen Unklarheit besteht, bleibt dies alles spekulativ.

4.1.2. 5-Glucosidierung

Die 5-Glucosidierung ist eine der Modifikationen, die die gebildeten Anthocyanidin 3-Glucoside in Matthiola incana erfahren koennen. Der erste Nachweis und die Charakterisierung eines Enzyms, das die Glucosidierung von Anthocyanen in 5-Position katalysiert und durch Gen m kontrolliert ist, gelang in Silene dioica (Kamsteeg et al. 1978b, 1980b). In Petunia hybrida wurde ebenfalls eine 5 GT gefunden (Jonsson et al. 1984b).

Eine 5 GT-Aktivitaet konnte in Blueten von Matthiola incana nachgewiesen werden. Das Enzym zeigt im Vergleich zur 3 GT eine geringere Stabilitaet. Ferner zeigt die Reaktion ein pH-Optimum bei 7.5 und ist wesentlich empfindlicher gegenueber divalenten Ionen und anderen Zusaetzen. Auffallend ist die totale Hemmung der Reaktion, wenn das Substrat in EGME geloest ist, waehrend die 3-Glucosidierung davon unbeinflusst bleibt. Wie die HPLC-Analyse beweist, ist die Inhibition durch EGME nicht auf die Zersetzung des Substrates in diesem Loesungsmittel zurueckzufuehren, sondern liegt an einer Hemmung der Reaktion durch EGME. Auch die Untersuchungen zum Verlauf der Enzymaktivitaet der 3 GT und der 5 GT waehrend der Bluetenentwicklung zeigen unterschiedliche Maxima. Es handelt sich demnach eindeutig um zwei verschiedene Glucosyltransferasen.

Die 5 GT setzt wie aus deren Abwesenheit in der Natur abgeleitet werden kann, Anthocyanidine nicht direkt zu den 5-Glucosiden um, selbst die 3-Glucoside sind schlechte Substrate. Auch dies ist nicht unerwartet, da die 3.5-Diglucoside in Matthiola incana in wesentlich geringeren Mengen vorkommen als die 3-Sambubiosid-5-Glucoside. Sind jedoch die 3-Glucoside und 3-Sambubioside mit p-

Cumar- oder Kaffeesaeure acyliert, so erfolgt eine wesentlich bessere Reaktion als mit den nicht-acylierten Verbindungen.

Bei Petunia hybrida wurden nur acylierte 3-Rutinoside in 5-Stellung glucosidiert (Jonsson et al. 1984b). Das Enzym aus Silene dioica glucosidiert hingegen 3-Glucoside, 3-Rutinoside und acylierte Rutinoside (Kamsteeg et al. 1978b und 1980b). Die 5 GT aus Matthiola incana, Silene dioica und Petunia hybrida unterscheiden sich bzgl. ihrer Substratspezifitaet betraechtlich. Korrelationen zwischen Gen und Enzymaktivitaet bzw. dem Vorhandensein von 5-glucosidierten Anthocyanen geben Aufschluss ueber die 5 GT-Aktivitaet in vivo. Die Inhaltsstoffanalysen zeigten, dass nur in den Linien von Matthiola incana, die Wildtypallele des Gen l besitzen, 5-glucosidierte Anthocyane vorhanden sind. Untersuchungen zur 5 GT-Aktivitaet in den Linien 01 - 08 mit den Substraten Cy 3-B, Cy 3-G und acylierten Cy 3-G fuehrten zu dem Ergebnis, dass nur in den Linien mit dominanten Allelen des Gens l, 5 GT-Aktivitaet vorliegt, waehrend sie in Linien mit rezessiven Allelen fehlt.

Ferner konnte gezeigt werden, dass Gen u keinen direkten regulatorischen Effekt auf die 5 GT ausuebt. Das Vorhandensein von geringen Mengen an 5-glucosidierten Anthocyanen in den Linien 03 und 07 ist allein darauf zurueckzufuehren, dass das passende Substrat fuer die 5 GT-Reaktion fehlt. Nur die acylierten Anthocyane werden nahezu vollstaendig in 5-Stellung durch die 5 GT glucosidiert. Diese acylierten Anthocyane werden aber nur in den Linien mit Wildtypallelen am Locus u gebildet. Auch Gen v beeinflusst die 5 GT nicht.

Diese Resultate belegen, dass Gen 1 die 5 GT kontrolliert und dass die in vitro gefundene Enzymaktivitaet fuer die 5-Glucosidierung in vivo verantwortlich ist. Die 3 GT-Aktivitaet zeigte keine Abhaengigkeit von Gen 1, sie war immer gleich. Die Korrelation von dominanten Allelen des Gen 1 und der 5 GT-Aktivitaet belegt nochmals eindeutig die Existenz von zwei verschiedenen Glucosyltransferasen.

4.1.3. Xylosylierung

Der erste eindeutige Nachweis einer Transferase, die die Anheftung eines 2.Zuckermolekuels an ein bereits vorhandenes katalysiert, konnte von Kamsteeg an definierten Genotypen von Silene dioica erbracht werden (Kamsteeg et al. 1980a). Das Enzym katalysiert die Uebertragung von L-Rhamnose auf Anthocyanidin 3-Glucosid, was zur Bildung von Anthocyanidin 3-rutinosiden fuehrt. Es unterliegt der Kontrolle des Gen N von Silene.

In Matthiola incana gibt es ebenfalls 3-Bioside, die jedoch als zweites Zuckermolekuel statt einer Rhamnose die Xylose besitzen und 3-Sambubioside genannt werden. Mit den beschriebenen Untersuchungen gelang es erstmalig eine Xylosyltransferase-Aktivitaet nachzuweisen und zu charakterisieren. Es handelt sich bei der Xylosyltransferase um ein loesliches Enzym, das wie die anderen Glycosyltransferasen keine Co-Faktoren benoetigt und von UDP-Xylose den Zucker auf das entsprechende Anthocyan uebertraegt. Die Reaktion ist ausschliesslich auf Xylose beschraenkt. Das Verhalten der Xylosyltransferase ist in vieler Hinsicht anders als das der 3- und 5- Glucosyltransferasen. Waehrend die Glucosyltransferasen zumindest ueber einige Tage stabil sind, ist nach

24 h bei -20°C Lagerung keine Xylosyltransferase-Aktivitaet mehr zu finden. Ferner gibt es einen betraechtlichen Aktivitaetsunterschied zwischen dem Rohextrakt und dem durch Sephadex G-50 gereinigtem Extrakt. Untersuchungen zur Temperaturempfindlichkeit zeigten, dass die Xylosyltransferase temperatursensitiver ist. Das Maximum der Reaktion liegt bei 30°C, hingegen liegt es fuer die Glucosyltransferasen bei 40°bzw. 50°C.

Im Gegensatz zu den Glucosyltransferasen liegt das pH-Optimum im sauren Bereich bei pH = 6.5, waehrend fuer die Rhamnosyltransferase von Silene dioica ein Optimum von 8.1 gefunden wurde.

Gemeinsam ist den Glycosyltransferasen ihre hohe Empfindlichkeit gegenueber bestimmten Ionen. Moegliche Erklaerungen fuer diesen Sachverhalt sind schon bei der 3 GT diskutiert worden. Auffallend ist die Stimulierung der Xylosyltransferase durch Ca^{2+}-Ionen. Dies wurde bei den 3- und 5-Glucosyltransferasen nicht beobachtet. Moeglicherweise ist das Fehlen von Ca^{2+} im gereinigten Enzymextrakt der Grund fuer die geringe Aktivitaet verglichen mit dem Rohextrakt.

Ein besonders interessantes Charakteristikum der Xylosyltransferase ist deren Substratspezifitaet. Aufgrund chemogenetischer Untersuchungen wurde angenommen, dass Anthocyanidin 3-Glucosid das richtige Substrat fuer die Xylosylierung sei und das sie unter der Kontrolle des pleiotropen Gens u stehe, das sowohl Acylierung als auch Xylosylierung betreffen sollte. Mit den Enzympraeparationen konnten zwar 3-Glucoside xylosyliert werden, hingegen wurden deutlich hoehere Umsatzraten mit den acylierten 3-Glucosiden erzielt. Die 3.5-Diglucoside und deren acylierte

Form wurden nicht als Substrate akzeptiert. Das steht im Gegensatz zu Silene dioica, wo die L-Rhamnose an das Anthocyanidin 3-glucosid und an das - 3.5-Diglucosid gebunden wird.
An dieser Stelle muss erwaehnt werden, dass Cy 3-G im Standardtest als Substrat eingesetzt wurde, obwohl die acylierten Cy 3-G bessere Substrate fuer die Xylosylierung waren.Die acylierten 3-Glucoside konnten nicht in genuegend grossen Mengen aus Blueten isoliert werden, da sie leicht in Cy 3-G und Saeuren zerfielen und so fuer den Standardansatz und zur eindeutigen Quantifizierung des Reaktionsgemisches als Substrat unbrauchbar waren. Sie konnten nur in geringen Mengen enzymatisch synthetisiert und fuer einige Vergleichstests verwendet werden.

Untersuchungen zur genetischen Kontrolle der Xylosyltransferase zeigten, dass Gen u das Enzym nicht kontrolliert. Genotypen mit rezessiven Allelen des Gen u, wie Linie 07 und 08 zeigen die gleiche Aktivitaet wie Linien mit Wildtypallelen (Linie 06). Wie schon beschrieben, kontrolliert Gen u die Acylierung. Diese Ergebnisse und die Tatsache, dass acylierte 3-Glucoside die besten Substrate fuer die Xylosylierung sind, lassen vermuten, dass erst durch die Acylierung das passende Substrat fuer die Xylosylierung geliefert wird. Erst wenn die Acylierung stattgefunden hat, koennen betraechtliche Mengen an 3-Sambubiosid durch die Xylosyltransferase, die in allen Genotypen vorhanden ist, gebildet werden (z.B. Linie 06). Ist keine Acylierung moeglich, so werden nur geringe Mengen an Sambubiosid aus dem schlechten Substrat unter Katalyse der Xylosyltransferase gebildet. Das bedeutet, dass die Acylierung eine Vorraussetzung fuer eine gute Xylosylierung

der 3-Glucoside ist. Aehnliche Verhaeltnisse fuer die Erklaerung der pleiotropen Wirkung des Gen Gf bzgl. der Acylierung und 5-Glucosidierung werden in Petunia hybrida gefunden (Jonsson et al. 1984b). Zunaechst wurde angenommen, dass Gen Gf die 5 GT kontrolliert (Wiering et al. 1973). Spaetere enzymatische Untersuchungen offenbarten, dass Gf nicht die 5 GT kontrolliert, sondern hoechstwahrscheinlich die Acylierung von 3-Glycosiden und dass durch die Acylierungsreaktion erst das richtige Substrat fuer die 5 GT gebildet wird. Dieses Enzym akzeptiert nicht Cy 3-Rhamnosyl-glucosid, sondern nur das entsprechend acylierte Anthocyan.

4.1.4. Acylierung

Die Acylierung ist eine weitere Modifikation der Anthocyane. In Blueten von Matthiola incana wurden in Inhaltsstoffanalysen nur Zimtsaeurederivate als Acylgruppen gefunden (Seyffert 1960). Acylierte Anthocyane liegen nur in den Genotypen vor, die dominante Allele an den Loci u und v besitzen. Dies fuehrte zu der Annahme, dass die Gene u und v die Acylierung kontrollieren. In Enzymextrakten der Linien von Matthiola incana mit dominanten Allelen am Locus u, konnte nun eine Acyltransferase-Aktivitaet nachgewiesen werden. Die Acyltransferase aus Matthiola incana uebertraegt nur Derivate der Zimtsaeuren. Die CoA-Ester der p-Cumar-und Kaffeesaeure sind fuer Cy 3-B gute Substrate zur Uebertragung der Acylgruppen, waehrend Ferulasaeure schlecht und Sinapinsaeure gar nicht uebertragen werden.

Untersuchungen zum Verlauf der Acyltransferase-Aktivitaet in den Bluetenstadien zeigten ein Maximum in Stadium 5. Alle Enzyme, die

Schritte katalysieren, die die Anthocyanidine stabilisieren bzw. modifizieren, weisen Maxima in den mittleren Stadien 4 oder 5 auf. Enzyme, die fruehere Schritte in der Biosynthese betreffen, haben ihre Maxima auch in frueheren Bluetenstadien (Dangelmayr et al. 1983).

Die Acyltransferase bleibt einige Tage bei der Lagerung bei -20°C stabil. Sie laesst sich wie das entsprechende Enzym aus Silene dioica von keinem Ion stimulieren, sondern wird mehr oder weniger stark inhibiert. Wie die anderen Transferasen in Matthiola incana wird das Enzym durch Fe^{2+} und Cu^{2+} besonders stark gehemmt. Ein Vergleich der Acyltransferasen in Silene und Matthiola zeigt, dass ihr Verhalten gegenueber p-CMB und EDTA und die pH-Optima verschieden sind. Ferner benutzen sie unterschiedliche Anthocyane als Substrate. Die Acyltransferase aus Silene dioica acyliert Anthocyanidin 3-Rhamnosylglucosid und Anthocyanidin 3-Rhamnosyl-glucosid-5-Glucosid (Kamsteeg et al. 1980c). Das Enzym aus Matthiola incana hingegen akzeptiert keine 5-glucosidierten Anthocyane als Substrate, sondern nur 3-Sambubioside und 3-Glucoside, wobei die 3-Glucoside die besseren sind. Anthocyanidine selbst werden nicht direkt acyliert, sondern muessen in 3-Stellung die Glucose tragen.

Um zu verifizieren, dass die Acyltransferase in vitro auch fuer die Acylierung in vivo verantwortlich ist, wurden die Mutanten 01 - 08 bzgl. ihrer Acyltransferase-Aktivitaet untersucht. Nur in den Enzymextrakten von Linien, die Wildtyp-Allele des Gen u besitzen, war Acyltransferase-Aktivitaet vorhanden. Linien mit rezessiven Allelen am Locus u wiesen keine Acyltransferase-Akti-

vitaet auf. Diese Tests wurden in verschiedenen Kombinationen von CoA-Estern und Anthocyanen durchgefuehrt. Cy 3-G und Cy 3-B werden mit p-Cumar-und Kaffeesaeure nur dann acyliert, wenn die Extrakte aus einer Linie mit dominanten Allelen am Locus u stammten.

Die aus chemogenetischen Untersuchungen postulierte pleiotrope Wirkung (Acylierung und Xylosylierung) von Gen u (Seyffert 1960) laesst sich damit erklaeren, dass erst durch die Acylierung das "richtige" Substrat fuer die Xylosylierung produziert wird. Allerdings verdeutlichen diese Studien auch, dass diese Acylierung von Gen v unabhaengig ist. Es wird in Linien mit rezessiven Allelen am Locus u und dominanten am Locus v keine Acylierung-Aktivitaet gefunden. Die Rolle des Gens v koennte darin bestehen, dass es zusaetzliche Acylierungen an bereits acylierten Anthocyanen bewirkt. Solche doppelt acylierten Verbindungen kommen in Matthiola incana vor (Seyffert 1960, Harborne 1964). Aus ersten Untersuchungen kann geschlossen werden, dass eine doppelte Acylierung mit p-Cumarsaeure ausscheidet. Vielleicht sind hier die Saeuren wie Ferula- und Sinapinsaeure, die schlechte Substrate fuer die erste Acylierung darstellen, die geeigneten Gruppen.

4.1.5. Reihenfolge der Reaktionsschritte in der Biosynthese

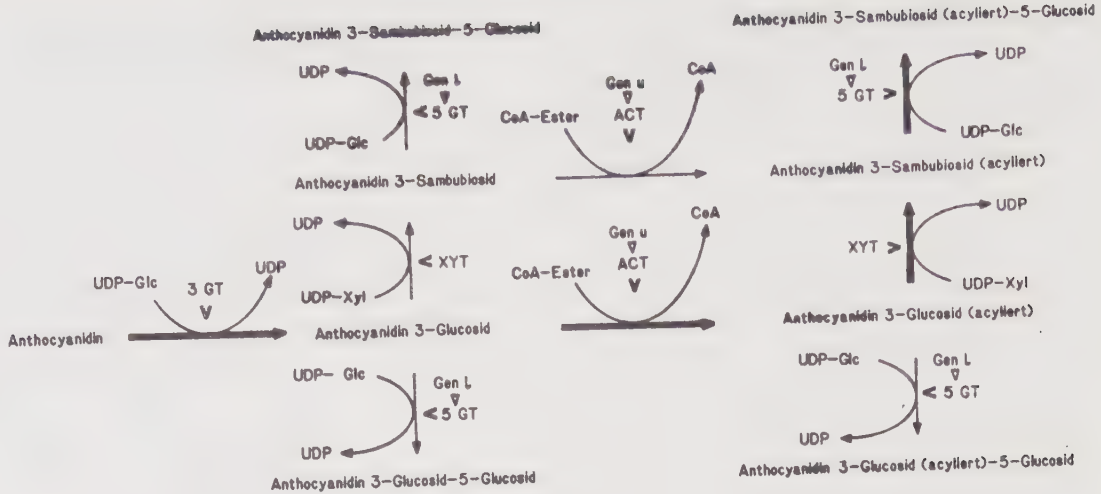
Die Ergebnisse von Anthocyananalysen der Genotypen von Matthiola incana und die Substratspezifitaet der einzelnen Enzyme fuehrt zu folgender Hypothese ueber die Sequenz der Modifikationsreaktionen in Matthiola incana.

Zunaechst werden die Anthocyanidine in 3-Stellung unter Wirkung

der 3 GT glucosidiert. Die 3 GT ist das einzige untersuchte Enzym, das Anthocyanidine als Substrate akzeptiert. 3 GT-Aktivitaet wurde in allen Linien gefunden. Das Anthocyanidin 3-Glucosid kann nun als Substrat fuer die Enzyme Acyl-, Xylosyl- und 5-Glucosyltransferase dienen. Fuer die Xylosyl- und 5-Glucosyltransferase ist das 3-Glucosid ein schlechtes Substrat. Hingegen ueberfuehrt die Acyltransferase die 3-Glucoside mit hoher Umsatzrate in die entsprechenden acylierten Verbindungen. Erst das acylierte Anthocyanidin 3-Glucosid stellt ein gutes Substrat fuer die Xylosylierung dar. Das bedeutet, dass in Linien, die die Acylierung erlauben, die Hauptsynthese des acylierten 3-Sambubiosids in folgender Reihenfolge ablaeuft: Zuerst findet Acylierung und dann Xylosylierung statt. Die umgekehrte Reaktionsfolge muss als Nebenweg betrachtet werden, der in Genotypen mit rezessiven Allelen des Gens u, der einzig moegliche ist. Die geringe Menge an unacyliertem 3-Sambubiosid laesst sich dadurch erklaeren, dass das 3-Glucosid ein schlechtes Substrat der Xylosyltransferase ist und somit nur geringe Mengen an 3-Sambubiosiden gebildet werden (s. Linie 08 oder 05). Hingegen weisen die entsprechenden Linien, die dominante Allele am Locus u besitzen, hohe Konzentrationen an acyliertem 3-Sambubiosid auf (Linie 06 oder 02). Die 5 GT kann die 3-Glucoside zu den 3.5-Diglucosiden nur mit geringer Reaktionsrate umsetzen. Die besseren Substrate sind die 3-Sambubioside, die acylierten 3-Glucoside und acylierten 3-Sambubioside. Die Ergebnisse der Substratspezifitaet der 5 GT stehen in Einklang mit den Konzentrationsdifferenzen zwischen den verschiedenen 5-glucosidierten Anthocyanen der Linie 07. Es sind nur geringe Mengen an 3.5-Diglucosiden, etwas groessere Mengen an 3-

Sambubiosid-5-Glucosid und grosse an 3-Glucosiden vertreten. Hohe Konzentrationen an 5-glucosidierten Anthocyanen weisen nur Linien auf, bei denen Acylierung erlaubt ist (Linie 01 und 04). Gemeinsam ist der Acyl- und der Xylosyltransferase, dass sie keine 5-glucosidierten Anthocyane als Substrate akzeptieren, waehrend die 5 GT acylierte Verbindungen sogar besser umsetzt als die reinen Anthocyanidin-Zucker-Verbindungen. Damit duerfte die 5 - Glucosidierung in Matthiola incana der letzte Schritt in der Biosynthese sein. Der mutmassliche Biosyntheseweg ist in Abb.23 dargestellt, er kann durch rezessive Allele an den entsprechenden Loci blockiert werden. Liegen nur dominante Allele vor, so dass alle Schritte erlaubt sind, so wird hauptsaechlich acyliertes Cy 3.5-T gefunden (Linie 01).

Eine andere Reihenfolge postulierte Kamsteeg fuer Silene dioica (Kamsteeg et al. 1980c). Hier werden 5-glucosidierte Anthocyane besonders gut acyliert, so dass in dieser Pflanze vermutlich die Acylierung der letzte Schritt ist. Die Verhaeltnisse in Petunia hybrida aehneln eher denen in Matthiola incana. Da die 5 GT nur die acylierten 3-Rhamnosylglucoside umsetzt, duerfte auch hier die 5-Glucosidierung der letzte Schritt sein (Jonsson et al. 1984b). Die Reihenfolge der Biosidbildung und Acylierung ist bei Petunien allerdings noch unklar.



ACT: Acyltransferase

3 GT: 3-Glucosyltransferase

5 GT: 5-Glucosyltransferase

XYT: Xylosyltransferase

Abb. 23: Biosyntheseweg der verschiedenen Anthocyane in Blueten von Matthiola incana

4.2. Callistephus chinensis

Die Gattung Callistephus chinensis stellte das zweite Untersuchungsobjekt dar. Analysen der Anthocyanextrakte zeigten, dass auch hier die Anthocyanidine als 3-Glucoside stabilisiert sind. Die weitere Glucosidierung in 5-Position wird vom Gen M kontrolliert. Bei rezessiven Allelen am Locus M liegen nur 3-Glucoside vor und bei dominanten Allelen auch die entsprechenden 3.5-Diglucoside (Forkmann 1977, Seyffert 1982, Teusch 1984). Wie in Matthiola incana wurden auch hier acylierte Glucoside nachgewiesen (Forkmann 1977, Teusch 1984). Jedoch handelt es sich bei den Acylgruppen nicht um Zimtsaeuren, sondern um aliphatische Saeuren (Takeda et al. 1986).
In der vorliegenden Arbeit konnte nicht nur eine 3 GT und 5 GT, sondern auch eine Acyltransferase nachgewiesen werden.

4.2.1. 3-Glucosidierung

Unter den an Matthiola incana optimierten Bedingungen wurde auch bei Callistephus chinensis hohe 3 GT-Aktivitaet in den anthocyanbildenden Linien nachgewiesen. Als Substrate wurden sowohl die Flavonole als auch die Anthocyanidine akzeptiert. Bei den anthocyanbildenden Linien O3 - O6 zeigte sich schon wie in Matthiola incana kein Unterschied in der 3 GT-Aktivitaet. Es konnte auch bei den anthocyanfreien Linien der Gattung Callistephus chinensis keine Mutante gefunden werden, deren 3 GT-Aktivitaet gleich null zu setzen war. Im Gegensatz zu den anthocyanfreien Linien von Matthiola incana gab es jedoch eine Linie, deren 3 GT-Aktivitaet

gesteigert war (10a). Ansonsten war die Aktivitaet verglichen mit den anthocyanbildenden Linien reduziert. Auch hier kann ausgeschlossen werden, dass die Gene a, e, f und g die 3-Glucosyltransferase kontrollieren. Sie beeinflussen die Enzymaktivitaet zwar, sind aber wahrscheinlich fuer andere Reaktionsschritte zwischen den Dihydroflavonolen und Anthocyanidinen verantwortlich, die jedoch im Fall von Gen a und g noch zu klaeren sind. Neuere Untersuchungen zeigten, dass Gen f die Dihydroflavonol 4-Reduktase kontrolliert (Ruhnau 1986). Moeglicherweise wirken auch bei Callistephus chinensis freie Anthocyanidine schaedigend auf die Zelle. Ferner ist die Spekulation ueber einen Enzymkomplex, der die letzten Schritte der Anthocyanbiosynthese kontrolliert auch hier vertretbar.

4.2.2. 5-Glucosidierung

Auch fuer diese Glucosidierungsreaktion wurden die gleichen Bedingungen benuetzt wie in Matthiola incana. In Blueten von Callistephus chinensis erwies sich jedoch das 3-Glucosid als das bessere Substrat. Anthocyanidin 3-Glucoside, die mit Malonsaeure acyliert waren, wurden nicht mehr in 5-Stellung glucosidiert. Wie aus chemogenetischen Untersuchungen erwartet, wird die 5 GT aus Callistephus chinensis von Gen M kontrolliert. Nur Linien mit dominanten Allelen an diesem Locus wiesen 5 GT-Aktivitaet auf waehrend sie in Linien mit rezessiven Allelen fehlt. Damit duerfte der Beweis erbracht sein, dass die in vitro gefundene 5 GT-Aktivitaet auch in vivo fuer die 5-Glucosidierung verantwortlich ist. Die genetischen Befunde belegen ferner, dass die Glucosidie-

rung in 3- bzw. 5-Stellung tatsaechlich von zwei verschiedenen Glucosyltransferansen katalysiert wird. So wurde in den Linien mit rezessiven Allelen am Locus M keine 5 GT-Aktivitaet, wohl aber hohe 3 GT-Aktivitaet gefunden.

4.2.3. Acylierung

Mit der Acyltransferase-Aktivitaet in Callistephus chinensis wurde erstmals ein Enzym beschrieben, das Dicarbonsaeuren auf Anthocyane uebertraegt. Anthocyane, die mit Malonsaeure acyliert sind, wurden schon beschrieben (Krause und Strack 1979, Hrazdina 1982, Harborne und Boardley 1985 . Die in Callistephus chinensis nachgewiesene Transferase beschraenkt sich auf die Uebertragung von Dicarbonsaeuren. Alle getesteten CoA-Ester von Zimt- oder Monocarbonsaeuren wurden nicht angenommen. Es scheint, dass die Dicarbonsaeure mit der kuerzesten CH_2-Kette zwischen den Carboxylgruppen die beste ist. Leider konnte die Frage der maximalen Laenge der CH_2-Kette zwischen den COOH-Gruppen nicht geklaert werden, da die entsprechenden CoA-Ester nicht zur Verfuegung standen.

Bezueglich der Substratspezifitaet des anderen Reaktionspartners, der Anthocyane, ist zu erwaehnen, dass im Gegensatz zu Matthiola incana 3.5-Diglucoside acyliert werden. Jedoch werden im Vergleich zu den 3-Glucosiden nur ca. 10% des Umsatzes erreicht. Dies entspricht der Acyltransferase in Silene dioica, die auch 3.5-Diglucoside acyliert, allerdings mit Hydroxyzimtsaeuren (Kamsteeg et al. 1980c). Im Gegensatz zu den Ergebnissen in Silene dioica und Matthiola incana werden keine Bioside acyliert. Sie sind als Inhaltsstoffe in Callistephus chinensis auch nicht

vertreten.

Da bisher in Callistephus chinensis keine Mutanten fuer die Acyltransferase identifiziert wurden, konnte nicht nachgewiesen werden, ob die in vitro gefundene Aktivitaet auch in vivo fuer diese Reaktion verantwortlich ist.

Das Enzym besitzt eine auffallend hohe Aktivitaet. Es laesst sich mehrere Wochen bei -20°C ohne Aktivitaetsverlust lagern und zeigt eine geringe Temperaturempfindlichkeit. So wurde bei 30°C und bei 80°C der gleiche Umsatz gemessen. Die noch sehr hohe Reaktionsrate bei 80°C wurde in den gesamten Untersuchungen ueber die Temperaturempfindlichkeit der anthocyanmodifizierenden Enzyme nirgends sonst gefunden.

Bezueglich der Empfindlichkeit gegenueber divalenten Ionen und anderen Zusaetzen wurden aehnliche Resultate wie bei Matthiola incana beobachtet. Die starke Reduktion des Umsatzes durch p-CMB faellt jedoch aus dem Rahmen und ist sicherlich als praegnante Eigenschaft dieser Reaktion zu werten.

Moeglicherweise besitzt die Malonylierung eine wichtige Bedeutung fuer die Pflanze. In Petroselium hortense wurde gezeigt, dass die Malonylierung fuer die Aufnahme der Flavonoide in die Vakuole wichtig ist (Matern et al. 1986). Vielleicht wird erst durch die Malonylierung ein Transport durch den Tonoplasten ermoeglicht. Ob diese Bedeutung der Malonylierung auch fuer die Anthocyane in Callistephus chinensis zutrifft, ist jedoch noch offen.

4.2.4. Reihenfolge der einzelnen Reaktionsschritte in der Biosynthese

Wie bisher in allen untersuchten Bluetenpflanzen gefunden, so ist auch bei Callistephus chinensis die 3-Glucosidierung die erste Reaktion nach der Anthocyanidin-Synthese.

Aufgrund der Anthocyananalyse kann das 3-Glucosid nun Substrat fuer die Acylierung und 5-Glucosidierung sein. In Linien mit dem Genotyp mm sind 3-Glucoside und acylierte 3-Glucoside vorhanden und in Linien mit den Allelen MM als Hauptkomponente 3.5-Diglucoside, deren acylierte Form, deutliche Mengen an 3-Glucosiden und acylierten 3-Glucosiden (Teusch 1984).

Untersuchungen zur Substratspezifitaet von 5 GT und Acyltransferase zeigten jedoch, dass zuerst die 5-Glucosidierung stattfindet. Die 5 GT glucosidiert keine acylierten 3-Glucoside, waehrend die Acyltransferase beide Anthocyane als Substrate akzeptiert. Das 3-Glucosid ist das wesentlich bessere Substrat. Dadurch wird die geringe Menge der acylierten Form des 3.5-Diglucosids gegenueber der hohen Konzentration des nicht-acylierten 3.5-Diglucosids in den Linien O1, O2 und O3 erklaert. Bei den 3-Glucosiden ist das Verhaeltnis von acylierter Form zur nicht-acylierten zu Gunsten der acylierten Verbindung verschoben (Linie O3 - O6)

Die Biosynthese der Anthocyane in Callistephus chinensis ist in Abbildung 24 aufgezeigt.

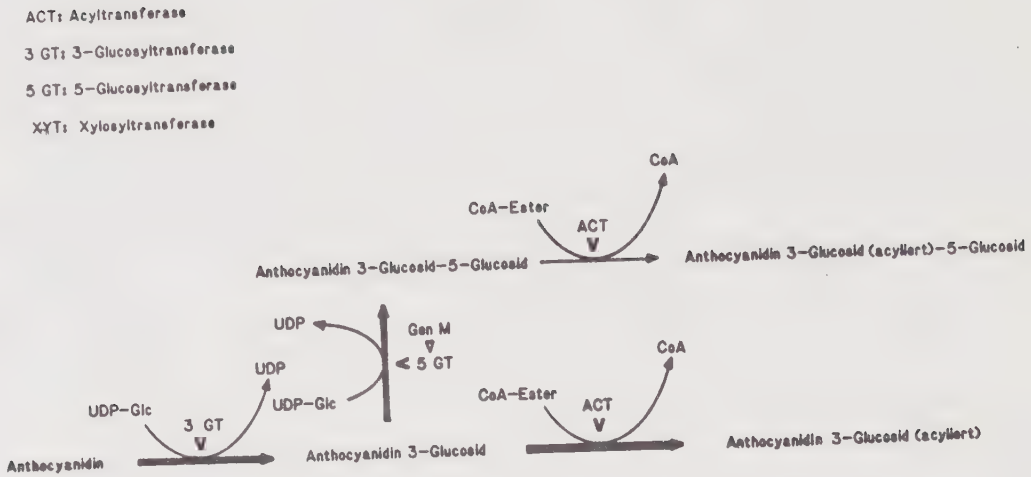


Abb. 24: Biosyntheseweg der verschiedenen Anthocyane in Blueten von Callistephus chinensis

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Anthocyane spielen eine wichtige Rolle bei der Farbgebung der Bluete. Die Stabilisierung der Anthocyanidine durch die 3-Glucosidbildung und die Modifizierung dieser Anthocyane in Matthiola incana und Callistephus chinensis wurden in der Arbeit untersucht. Die Enzyme, die diese Reaktionen katalysieren, wurden nachgewiesen und charakterisiert. Ferner konnte aufgrund von Anthocyananalysen genetisch definierter Linien und aufgrund der Substratspezifitaet der einzelnen Enzyme, die Reihenfolge der einzelnen Reaktionsschritte geklaert werden.

Die loesliche 3-Glucosyltransferase katalysiert die Uebertragung des Glucose-Molekuels von UDP-Glucose auf Anthocyanidine und Flavonole. Durch die Glucosidierung erfahren die Anthocyanidine, die selbst sehr schnell zerfallen, eine Stabilisierung. Die 3 GT ist sehr stabil und hoch aktiv. Die 3-Glucosidierung stellt den ersten Reaktionsschritt nach der Bildung der Anthocyanidine dar, da nur die 3 GT die Aglyca als Substrat akzeptiert. In Matthiola incana konnte nachgewiesen werden, dass beim Vorliegen rezessiver Allele an den Loci e, g und z, die Schritte zwischen den Dihydroflavonolen und Anthocyanidinen kontrollieren, die 3 GT-Aktivitaet reduziert ist. Bei Callistephus chinensis wurde das gleiche fuer die Loci a, f und g beobachtet. Allerdings konnte nie ein Totalausfall des Enzyms nachgewiesen werden. Somit ist keines dieser Gene als Strukturgen der 3 GT zu betrachten.

Bei der 5-Glucosyltransferase handelt es sich ebenfalls um ein

loesliches und relativ stabiles Enzym. Es katalysiert die Anheftung von Glucose in 5-Stellung. Das Enzym aus Matthiola incana bevorzugt die acylierten 3-Sambubioside und 3-Sambubioside als Substrate, waehrend mit acylierten 3-Glucosiden und 3-Glucosiden ein geringerer Umsatz stattfindet. Das Gen 1 kontrolliert die 5 GT-Aktivitaet. In Matthiola incana duerfte die 5-Glucosidierung der letzte Schritt in der Biosynthese sein.
Die 5 GT in Callistephus chinensis glucosidiert nur die 3-Glucoside. Acylierte Anthocyane werden nicht verwertet. Hier unterliegt die 5 GT der Kontrolle des Gens M.

Die Xylosyltransferase ist nur in Matthiola incana nachweisbar. Sie haengt Xylose an die Glucose in 3-Stellung an. Das Enzym ist sehr instabil, es zerfaellt innerhalb von 24 h bei -20° C. Die bevorzugten Substrate sind die acylierten Anthocyanidin 3-Glucoside, aber auch die Anthocyanidin 3-Glucoside selbst werden xylosyliert. Anthocyane, die bereits in 5-Stellung glucosidiert sind, werden nicht mehr xylosyliert. Acylierung der Anthocyanidin 3-Glucoside ist die Vorausetzung fuer einen guten Umsatz. In Genotypen, bei denen Acylierung moeglich ist, duerfte die Synthese von acyliertem Anthocyanidin 3-Sambubiosid in der Reihenfolge erst Acylierung und dann Xylosylierung vorherrschen, waehrend die umgekehrte Reihenfolge als Nebenweg angesehen werden muss, der in Linien mit rezessiven Allelen am Locus u der einzig moegliche ist.

Die Acyltransferase aus Matthiola incana katalysiert die Uebertragung von Zimtsaeuren der CoA-Ester auf die Anthocyanidin 3-

Glucoside und - 3-Sambubioside. Mit p-Cumarsaeure-CoA und Anthocyanidin 3-Glucosid ergibt sich der hoechste Umsatz. Das Enzym ist ueber mehrere Tage bei -20°C stabil und wird durch Gen u kontrolliert. Der Zeitpunkt der Acylierungsreaktion liegt vor der 5-Glucosidierung und laeuft auf der Stufe der 3-Glucoside und 3-Sambubioside ab, wobei der Hauptsyntheseweg in der Reihenfolge erst Acylierung und dann Xylosylierung ablaeuft.

Die Acyltransferase aus Callistephus chinenesis katalysiert die Uebertragung von Dicarbonsaeuren auf 3-Glucoside und 3.5-Diglucoside. Das beste Substrat ist das Anthocyanidin 3-Glucosid und die beste Acylgruppe ist die Malonsaeure. Auch diese Acyltransferase erweist sich als relativ stabil. Die Acylierung duerfte hier der letzte Reaktionsschritt bei der Modifizierung der Anthocyane sein, da acylierte 3-Glucoside nicht mehr in 5-Stellung glucosidiert werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

BRADFORD G.M. 1976: A rapid and sensitiv method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding.

Anal. Biochem. 72: 248 - 254

BRITSCH L., HELLER W. and GRISEBACH H. 1981: Conversion of flavanone to flavone, dihydroflavonol to flavonol with an enzyme system from cell cultures of parsley.

Z. Naturforsch. 36c: 742 - 750

BRITSCH L. and GRISEBACH H. 1985: Improved preparation and assay conditions of chalcone synthase.

Phytochem. 24: 1975 - 1976

DANGELMAYR B. 1982: Nachweis von Enzymen der Flavonoidbiosynthese und der genetischen Kontrolle von Chalkon-Isomerase-Aktivitaet in Blueten.

Dissertation, Tuebingen

DANGELMAYR B., STOTZ G., SPRIBILLE R. and FORKMANN G. 1983: Relationship between flower developement, anthocyanin accumulation and activity of enzymes involved in flavonoid biosynthesis in Matthiola incana R.Br.

Z. Naturforsch. 38c: 551 - 555

DIESPERGER H., MUELLER C. R. and SANDERMANN H. 1974: Rapid Isolation of plant microsomal fraction by Mg^{2+} precipitation.
FEBS Lett. 43: 155 - 158

DOONER H.K. and NELSON O.E. 1977: Genetic control of UDP-glucose: flavonol 3-O-glucosyltransferase in endosperm of maize.
Biochem. Genet. 15: 509 - 519

EBEL J., HAHLBROCK K. and GRISEBACH H. 1972: Purification and properties of an o-dihydricphenol meta-O-methyltransferase from cell suspension cultures of parsley and its relation to flavonoid biosynthesis.
Biochim. Biophys. Acta 268: 313 - 326

FOLCH J., LEES M. and STANLEY G.H.S. 1956: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues.
J. Biol. Chem. 226: 496 - 509

FORKMANN G. 1977a: Precursers and genetic control of anthocyanin synthesis in Matthiola incana R. Br.
Plant 137: 159 - 163

FORKMANN G. 1977b: Anthocyanin pigments in Callistephus chinensis.
Phytochem. 16: 299 - 301

FORKMANN G. und SEYFFERT W. 1972: Die Simulation quantitativer Merkmale durch Gene mit biochemisch definierbarer Wirkung.
V. Untersuchungen zur Messmethodik.
Theor. Appl. Genet. 42: 279 - 287

FORKMANN G. 1979: Flavanones and dihydroflavonols as biosynthetic intermediates in Matthiola incana.
Phytochem. 16: 1973 - 1975

FORKMANN G. 1980: The B-ring hydroxylation pattern of the intermediates of anthocyanin synthesis in pelargonidin- and cyanidin-producing lines of Matthiola incana.
Planta 148: 157 - 161

FORKMANN G. and KUHN B. 1979: Genetic control of chalcone isomerase activity in anthers of Petunia hybrida.
Planta 144: 189 - 192

FORKMANN G. and DANGELMAYR B. 1980: Genetic control of chalcone isomerase activity in flowers of Dianthus caryophyllus.
Biochem. Genet. 18: 519 - 527

FORKMANN G., HELLER W. and GRISEBACH H. 1980: Anthocyanin biosynthesis in flowers of Matthiola incana, flavanone 3- and 3'-hydroxylases.
Z. Naturforsch. 35c: 691 - 695

FORKMANN G. and STOTZ G. 1981: Genetic control of flavanone 3-hydroxylase activity and flavonoid 3'-hydroxylase activity in Anthirrhinum majus (Snapdragon).
Z. Naturforsch. 36c: 411 - 416

FORKMANN G., de VLAMING P., SPRIBILLE R., WIERING H. and SCHRAM A.W. 1986: Genetic and biochemical studies on the conversion of dihydroflavonols to flavonols in flowers of Petunia hybrida.
Z. Naturforsch. 41c: 179 - 186

FRITSCH H. and GRISEBACH H. 1975: Biosynthesis of Cyanidin in cell cultures of Happlogracilis.
Phytochem. 14: 2437 - 2442

FROEMEL S., de VLAMING P., STOTZ G., WIERING H., FORKMANN G. and SCHRAM A.W. 1985: Genetic and biochemical studies on the conversion of the flavanones to dihydroflavonols in flowers of Petunia hybrida.
Theor. Appl. Genet. 70: 561 - 568

GERATS A.G.M., WALLROTH M., DONKER-KOOPMAN W., GROOT S.P.C. and SCHRAM A.W. 1983: The genetic control of the enzyme UDP-glucose: 3-O-flavonoid-glucosyltransferase in flowers of Petunia hybrida.
Theor. Appl. Genet. 53: 157 - 167

GRISEBACH H. 1962: Die Biosynthese der Flavonoide.
Planta Medica 10: 385 - 397

GRISEBACH H. and BARZ W. 1969: Biochemie der Flavonoide.
Naturwiss. 56: 538 - 544

HAGMANN M.L., HELLER W. and GRISEBACH H. 1983: Induction and characterization of microsomal flavonoid 3'-hydroxylase from parsley cell cultures.
Eur. J. Biochem 134: 547 - 554

HARBORNE J.B. 1964: Plant polyphenols - XI. The structure of acylated anthocyanins.
Phytochem. 3: 151- 160

HARBORNE J.B. 1967: The anthocyanin pigments. In: Comparative Biochemistry of flavonoids.
Academic Press, London/New York: 1 - 36

HARBORNE J.B. and BOARDLEY M. 1985: The widespread occurrence in nature of anthocyanins as Zwitterions.
Z. Naturforsch. 40c: 305 - 308

HAYASHI K. and TAKEDA K. 1970: Further purification and component analysis of commelinin showing te presence of magnesium in this blue complex molecule.
Proc. Japan Acad., 46: 535 - 540

HEINZMANN U., SEITZ H.U. and SEITZ U. 1977: Purification and substrate specifities of hydroxycinnamate: CoA-ligase from anthocyanin-containing and anthocyanin-free carrot cells.
Planta 135: 313 - 318

HELLER W. and HAHLBROCK K. 1980: Highly purified flavanone synthase from parsley catalyzes the formation of naringenin chalcone.
Arch. Biochem. Biophys. 200: 617- 619

HELLER W., BRITSCH L., FORKMANN G. and GRISEBACH H. 1985a: Leuco-anthocyanidins as intermediates in anthocyanidin-biosynthesis in flowers of Matthiola incana R. Br.
Planta 163: 191 - 196

HELLER W., FORKMANN G., BRITSCH L. and GRISEBACH H. 1985b: Enzymatic reduction of (+)dihydroflavonols to flavan-3,4-cis-diols with flower extracts from Matthiola incana and its role in anthocyanin biosynthesis.
Planta 165: 284 - 287

HRAZDINA G. 1982: Anthocyanins. In: The flavonoids, advances in research .
Chapman and Hall, London: 135 - 188

JONSSON L.M.V., AARSMAN M.E.G., BASTIAANNET J., DONKER-KOOPMAN W.E., GERATS A.G.M. and SCHRAM A.W. 1984a: Common identity of UDP-glucose: anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase and UDP-glucose: flavonol 3-O-glucosyltransferase in flowers of Petunia hybrida.

Z. Naturforsch. 39c: 559 - 567

JONSSON L.M.V., AARSMAN M.E.G., van DIEPEN J., de VLAMING, SMIT N. and SCHRAM A.W. 1984b: Properties and genetic control of anthocyanin 5-O-glucosyltransferase in flowers of Petunia hybrida.

Planta 160: 341 - 347

KAMSTEEG J., van BREDERODE J. and van NIGTEVECHT G. 1978a: Identification and properties of UDP-glucose: cyanidin 3-O-glucosyltransferase isolated from petals of the Red Campion (Silene dioica).

Biochem. Genet. 16: 1045 - 1058

KAMSTEEG J., van BREDERODE J. and van NIGTEVECHT G. 1978b: Identification, properties, and genetic control of UDP-glucose: cyanidin 3-rhamnosyl (1 → 6)-glucoside 5-O-glucosyltransferase isolated from petals of the Red Campion (Silene dioica).

Biochem. Genet. 16: 1059 - 1071

KAMSTEEG J., van BREDERODE J. and van NIGTEVECHT G. 1980a: The pH-dependent substrate specifity of UDP-glucose: anthocyanidin 3-rhamnosylglucosid, 5-O-glucosyltransferase in petals of Silene dioica: the formation of anthocyanidin 3,5-diglucosides.

Z. Pflanzenphysiol. 96: 87 - 93

KAMSTEEG J., van BREDERODE J. and van NIGTEVECHT G. 1980b: Identification, properties and genetic control of UDP-L-rhamnose: anthocyanidin 3-O-glucoside, 6‴-O-rhamnosyltransferase isolated from petals of the Red Campion (Silene dioica).
Z. Naturforsch. 35c: 249 - 257

KAMSTEEG J., van BREDERODE J., HOMMELS C.H. and van NIGTEVECHT 1980c: Identification, properties and genetic control of hydroxycinnamoyl-Coenzyme A: anthocyanidin 3-rhamnosyl (1 → 6) glucoside, 4‴-hydroxycinnamoyltransferase isolated from petals of Silene dioica.
Biochem. Physiol. Pflanzen 175: 403 - 41

KAPPERT H. 1949: Die Genetik des incana-Charakters und der Anthocyanbildung bei der Levkoje.
Zuechter 19: 289 - 297

KHO K.F.F., KAMSTEEG J. and van BREDERODE J. 1978: Identification, properties and genetic control of UDP-glucose: cyanidin 3-O-glucosyltransferase in Petunia hybrida.
Z. Pflanzenphysiol. 88: 449 - 464

KRAUSE J. and STRACK D. 1979: Malonyl cyanidin 3-monoglucoside in Spirodela polyrrhiza (L.) Schleiden.
Z. Pflanzenphysiol. 95: 183 - 187

KREUZALER F. and HAHLBROCK K. 1972: Enzymatic synthesis of aromatic compounds in higher plants: formation of naringenin (5, 7, 4‴-trihydroxyflavanone) from p-coumaroyl-coenzyme A and malonyl-coenzyme A.
FEBS Lett. 28: 69 - 72

KREUZALER F. and HAHLBROCK K. 1975a: Enzymatic synthesis of the aromatic ring from acetat units. Partial purification and some properties of flavanone sythase from cell suspension cultures of Petroselium hortense.
Eur. J. Biochem. 56: 205 - 213

KREUZALER F. and HAHLBROCK K. 1975b: Enzymatic synthesis of aromatic compounds in higher plants.
Arch. Biochem. Biophys. 169: 205 - 213

KUHN B., FORKMANN G. and SEYFFERT W. 1978: Genetic control of chalcone-isomerase activity in Callistephus chinensis.
Planta 138: 199 - 203

LARSON R.L. and LONGERGAN C.M. 1973: Flavonoid-glucosyltransferase activity in Maize.
Cereal Res. Commun. (Hungary) 1: 13

LARSON R.L. 1971: Glucosylation of quercetin by a maize pollen enzyme.
Phytochem. 10: 3073 - 3076

LARSON R.L. and COE E.H. 1977: Gene-dependent flavonoid glucosyl-transferase in maize.
Biochem. Genet. 15: 153 - 156

LOEWER R. 1976: Untersuchungen zur Genetik der weissen und gelben Bluetenfarbe der Sommeraster Callistephus chinenesis (L.) Nees.
Diplomarbeit, Tuebingen

MATERN U., REICHENBACH C. and HELLER W. 1986: Efficient uptake of flavonoids into parsley (Petroselinum hortense) vacuoles requires acylated glycosides.
Planta 167: 183 - 189

NOÉ W. 1982: Regulation der Phenylalanin-Ammonium-Lyase bei Anthocyan-haltigen Zellsuspensionskuturen von Daucus carota. Dissertation , Tuebingen

RAUEN H.M. 1964: Biochemisches Taschenbuch, Teil 2. Springer, Berlin-Goettingen-Heidelberg-New York

RITTER-THOMAS U. 1973: Beitrag zur Kenntnis der Inhaltsstoffe von Matthiola incana. Planta 114: 259 - 268

RUHNAU B., Diplomarbeit, Tuebingen (in Vorbereitung)

SALEH N.A.M., FRITSCH H., WITKOP P. and GRISEBACH H. 1976a: UDP-glucose: cyanidin 3-O-glucossyltransferase from cell cultures of Haplopappus gracilis. Planta 133: 41 - 45

SALEH N.A.M., POULTON J.E. and GRISEBACH H. 1976b: UDP-glucose: cyanidin 3-O-glucosyltransferase from red cabbage seedlings. Phytochem. 15: 1865 - 1868

SEYFFERT W. 1960: Ueber die Wirkung von Bluetenfarbengenen bei der Levkoje, Matthiola incana R. Br. Z. Pflanzenzuecht. 44: 4 - 29

SEYFFERT W. 1962a: Ueber Geninteraktionen bei der Ausbildung von Bluetenfarben. XVI. Intern. Hort. Congr., Brussels, 19 - 28

SEYFFERT W. 1962b: Genetische Untersuchungen an Matthiola incana. I. Genlokalisation bei Kopplung mit einem Letalfaktor und Interaktion mit einem frei spaltenden Gen. Biol. Zbl. 81: 253 - 266

SEYFFERT W. 1982: Beitraege zur Genetik und Enzymologie der Flavonoide.

Biol. Zbl. 101: 465 - 483

SEYFFERT W. 1971: Simulation of quantitative characters by genes with biochemically definable action.

II. The material.

Theor. Appl. Genet. 41: 285 - 291

SPRIBILLE R. and FORKMANN G. 1981: Genetic control of chalcone synthase activity in flowers of Matthiola incana R. Br.

Z. Naturforsch. 36c: 619 - 624

SPRIBILLE R. and FORKMANN G. 1984: Conversion of dihydroflavonols to flavonols with enzyme extracts from flowers buds of Matthiola incana.

Z. Naturforsch. 39c: 714 - 719

STOTZ G. and FORKMANN G. 1981: Oxidation of flavanones to flavones with flower extracts of Antirrhinum majus (Snapdrogon).

Z. Naturforsch. 36c: 737 - 741

STOTZ G., SPRIBILLE G. and FORKMANN G. 1984: Flavonoid biosynthesis in flowers of Verbena hybrida.

J. Plant Physiol. 116: 173 - 183

STOTZ G., de VLAMING P., WIERING H., SCHRAM A.W. and FORKMANN G. 1985: Genetic control and biochemical studies on flavonoid 3'-hydroxylation in flowers of Petunia hybrida.

Theor. Appl. Genet. 70: 300 - 305

SUETFELD R., KEHREL B. and WIERMANN R. 1978: Characterization, developement and localisation of flavanone synthase in tulip anthers.

Z. Naturforsch. 33c: 841 - 846

SUETFELD R. and WIERMANN R. 1981: Purification of chalcone synthase from tulip anthers and comparison with the synthase from Cosmos petals.

Z. Naturforsch. 36c: 30 - 34

SUTTER A.H. and GRISEBACH H. 1973: UDP-glucose:flavonol 3-O-glucosyltransferase from cell suspension cultures of parsley.

Biochim. Biophys. Acta 309: 289 - 295

SUTTER A.H., POULTON J. and GRISEBACH H. 1975: Oxidation of flavanone to flavone with cell-free extracts from young parsley leaves.

Arch. Biochem. Biophys. 170: 547 - 556

TAKETA H. and HAYASHI 1977: 1. Metallo-anthocyanins I. Reconstruction of commelinin from its components, awobanin, flavocommelin and magnesium.

Proc. Japan Acad., 53, Ser. B: 1 - 5

TAKETA K. 1977: 55. Metallo-anthocyanins. II. Further experiments of synthesizing crystalline blue metallo-anthocyanins using various kinds of bivalent metals.

Proc. Japan Acad., 53, Ser. B: 257 - 261

TAKETA K., FUJII T. and IIDA M. 1984: Magnesium in the blue complex commelinin.

Phytochem. 23: 879 - 881

TAKEDA K., HARBORNE J.B. and SELF R. 1986: Identification and distribution of malonated anthocyanins in plants of the compositae.
Phytochem. 25: 1337 - 1342

TEUSCH M. 1984: Entwicklung von Methoden zur Analyse von Flavonoiden aus Bluetenextrakten genetisch definierter Pflanzen mit Hilfe der HPLC.
Diplomarbeit, Tuebingen

TIMBERLAKE C.F. and BRIDLE P. 1975: The anthocyanins. In: The flavonoids.
Chapman and Hall: 214 - 266

WELLMANN E., HRAZDINA G. and GRISEBACH H. 1976: Induction of anthocyanin formation and of enzymes related to its biosynthesis by UV-light in cell cultures of Happlopappus gracilis.
Phytochem. 15: 913 - 915

WIERING H. and de VLAMING P. 1973: Glycosylation and methylation patterns of anthocyanins in Petunia hybrida. The gene Gf.
Genen. Phaenen 16: 35 - 50

WIERMANN R. and BUTH-WEBER 1980: The distribution and localisation of an UDP-glucose: flavonol 3-O-glucosyl transferase activity in pollen.
Protoplasma 104: 307 - 313

WIT F. 1937: Contributions to the genetics of the china aster.
Genetica 19: 1- 109

Meine akademischen Lehrer waren:

Ammermann, Bayer, Bentrup, Bunke, Engelmann, Frey, Gönnenwein, Hager, Hanack, Hemleben, Jung, Kemmler-Sack, Krug, Kunze, Lindner, Lorenz, Oberhammer, Oberwinkler, Oelkrug, Pommer, Rähle, Rüdorff, Schenk, Schwemmle, Seelig, Seitz H. U., Seitz U., Seyffert, Sperlich, Strähle, Wenk, Winkelmann, Wöhrmann, Zähner, Zeil.

Lebenslauf

26. 04. 55	geboren in Wittlich (Rheinland-Pfalz) als Tochter des Grund- und Hauptschullehrers Hans Teusch und seiner Ehefrau Maria, geb. Teusch
1962-1966	Grundschule in Manderscheid (Rheinland-Pfalz)
1966-1968	neusprachliches Gymnasium in Daun
1968-1974	neusprachliches Gymnasium in Wittlich
1974	Abitur
1974-1982	Chemie-Studium an der Universität Tübingen
1978	Vordiplom-Prüfung in Chemie
1981	Diplom-Prüfung in Chemie
1981-1982	Diplomarbeit über das Thema "HPLC-Reinigung und Analyse synthetischer DNA-Fragmente" unter Anleitung von Prof. Dr. H. Schott
1977-1984	Biologie-Studium an der Universität Tübingen
1980	Zwischenprüfung in Biologie
1981	Vordiplom-Prüfung in Biologie
1983	Diplom-Prüfung in Biologie
1983-1984	Diplomarbeit über das Thema "Entwicklung von Methoden zur Analyse von Flavonoiden aus Blütenextrakten genetisch definierter Pflanzen mit Hilfe der HPLC" unter Anleitung von Prof. Dr. W. Seyffert
1984-1986	Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrbereich für Genetik, an der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. W. Seyffert über das Thema "Enzymologie und Genetik der Glycosidierungs- und Acylisierungsreaktionen in der Flavonoid-Biosynthese höherer Pflanzen"
1984-1986	Wissenschaftliche Hilfskraft (DFG) am Institut für Biologie II, Lehrbereich für Genetik

Druck und Verarbeitung: Dissertations Druck Darmstadt, Tel: 0 61 51 / 21 3 53